



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO  
TECNOLÓGICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

**SORAIA BAIA DOS SANTOS**

**Toxicidade aguda do pesticida clorpirifós de formulação  
comercial em tambaqui (*Colossoma macropomum*, CUVIER, 1818)**

**Santarém-PA  
2019**

**SORAIA BAIA DOS SANTOS**

**Toxicidade aguda do pesticida clorpirifós de formulação comercial em tambaqui (*Colossoma macropomum*, CUVIER, 1818)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade Federal do Oeste do Pará, para obtenção do título de Mestre em Biociências. **Área de concentração:** Fisiologia Ambiental. – **Linha de Pesquisa:** Biologia Experimental.

**Orientador:** Prof. Dr. Ruy Bessa Lopes

**Co-orientador:** Prof. Dr. Maxwell Barbosa de Santana

**Santarém-PA  
2019**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**  
**Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA**

---

S237t Santos, Soraia Baia dos

Toxicidade aguda do pesticida clorpirifós de formulação comercial em tambaqui (*Colossoma macropomum*, CUVIER, 1818)./ Soraia Baia dos Santos. – Santarém, 2019.

87 p. : il.

Inclui bibliografias.

Orientador: Ruy Bessa Lopes

Coorientador: Maxwell Barbosa de Santana

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação Tecnológica, Programa de Pós-Graduação em Biociências.

1. *Colossoma macropomum*. 2. Clorpirifós. 3. Toxicidade aguda. I. Lopes, Ruy Bessa, orient. II. Santana, Maxwell Barbosa de, coorient. III. Título.

CDD: 23 ed. 615.902098115

---

Bibliotecária – Documentalista: Mary Caroline Santos Ribeiro – CRB/2 566

**SORAIA BAIA DOS SANTOS**

**Toxicidade aguda do pesticida clorpirifós de formulação comercial em tabaqui (*Colossoma macropomum*, CUVIER, 1818)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade Federal do Oeste do Pará, para obtenção do título de Mestre em Biociências. **Área de concentração:** Fisiologia Ambiental. – **Linha de Pesquisa:** Biologia Experimental.

**Orientador:** Prof. Dr. Ruy Bessa Lopes

**Co-orientador:** Prof. Dr. Maxwell Barbosa de Santana

Conceito:

Data de Aprovação \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Prof. Dr. Ruy Bessa Lopes.

Orientador - Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA)

---

Profa. Dra. Flávia Garcez da Silva

Membro Titular Externo da Banca

Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA)

---

Prof. Dr. Ricardo Bezerra de Oliveira

Membro Titular Interno da Banca

Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA)

## DEDICATÓRIA

*Dedico à Deus, que me proporciona forças para prosseguir em todas as circunstâncias.*

*Dedico aos meus pais “ Sebastiana e Vital”, pois são em tudo meu porto seguro, e me mostram sempre que “nasci pra ser livre, mas preciso saber pra onde voltar.*

*Dedico à minha irmã “Suely”, pois sempre se importa comigo, perto ou longe, que nem o nosso laço de irmandade justifica o quanto sua existência se faz importante para mim.*

## AGRADECIMENTOS

Toda gratidão à Deus, em quem sempre deposito a minha fé, e só nEle encontro razão para acreditar em dias melhores vindouros. Sou plenamente grata à Ele por tudo em minha vida.

Agradeço imensamente aos meus pais e irmãos, que são dádivas de Deus na minha vida, emanando positividade em todos os momentos. Principalmente pelos gestos de amor e compreensão que me inspiram, além de suprir com minhas necessidades, dando apoio familiar incondicional.

Agradeço ao Prof. Dr. **Ruy Bessa Lopes**, por aceitar me orientar e estar sempre disposto a partilhar seus conhecimentos, contribuindo e agregando em cada passo deste trabalho. Sou muito grata por todos os aprendizados adquiridos com a sua contribuição, e pela oportunidade de todas as experiências vivenciadas nesse percurso. Muito obrigada!

Agradeço ao Prof. Dr. **Maxwell Barbosa de Santana**, por ter me concedido a oportunidade e confiança de sua orientação. Agradeço seus conselhos e ensinamentos, pois em cada experiência me transmitiu conhecimentos valiosos que foram fundamentais para o meu aprendizado e desempenho nessa trajetória. Sou muito grata por todo seu apoio e incentivo para a concretização desta pesquisa. Muito obrigada!

Agradeço ao Prof. Dr. **Lucinewton Moura**, por “escancarar” as portas do Laboratório de Química Aplicada a Toxicologia, Saneamento Ambiental e Recursos Hídricos da UFOPA, para que as atividades experimentais fossem cumpridas.

Agradeço às técnicas de laboratório, **Jandira Oliveira** e **Mila Canto**, por toda atenção, carinho, e cortesia. Pelos tantos momentos de descontração e gargalhadas compartilhados que tornaram minha rotina no “labquim” mais agradável. Muito obrigada!

Agradeço à **Milena Vasconcelos**, pelo companheirismo de laboratório, pelo compartilhamento de ideias em meio às correrias de experimentos, pelas conversas e risos, sem esquecer das comilanças e caronas. Muito obrigada!

Agradeço ao **João David Lisbôa**, pela gentileza em me auxiliar e dividir experiências comigo, mesmo estando acarretado com atividades em seu mestrado. Muito obrigada!

Agradeço à todos os membros do grupo de pesquisa “**Neuroamazônia**” da UFOPA. Em especial à **Daniela Viana**, **Nataniely Pimentel**, **Osléias Aguiar**, pois não mediram

esforços para estar me auxiliando na manutenção dos animais e atividades experimentais. Muito obrigada!

Agradeço à **Alessandra Silva**, pela parceria de vários momentos, por me permitir participar de suas atividades no laboratório, pois foram experiências que me prepararam de antemão para muitos dos desafios dessa jornada. Muito obrigada!

Agradeço à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES**, pelo fomento através da concessão da bolsa de estudos. Muito obrigada!

Agradeço à **Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA**, pelo apoio institucional para que este trabalho viesse a ser consolidado. Muito obrigada!

Agradeço ao **Programa de Pós-Graduação em Biociências - PPGBIOC** da UFOPA, pelo título do mestrado. Muito obrigada!

Por fim, quero agradecer à todos os familiares e amigos que se fizeram presentes em minha vida sendo reforço para os meus dias, e também àqueles que mesmo ausentes, e não menos importantes, estiveram torcendo e intercedendo por mim. A recíproca é verdadeira, não foi fácil, mas cheguei até aqui com a convicção de que posso contar com muitos.

*“Cada pessoa que passa em nossa vida deixa um pouco de si e leva um pouco de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida, e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.”*

*“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu...”*

*(Eclesiastes Cap. 3)*



## RESUMO

Avaliar a toxicidade de pesticidas utilizados nas lavouras temporárias e permanentes para organismos aquáticos permite elucidar perturbações instaladas recentemente ou agregadas ao longo do tempo. Assim, este estudo ecotoxicológico buscou avaliar a toxicidade aguda do pesticida clorpirifós 48% (Klorpan<sup>®</sup> 480EC) a fim de determinar a concentração média letal (CL<sub>50-96h</sub>) para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*). A sensibilidade tóxica do organismo-teste foi avaliada preliminarmente utilizando-se a substância-referência “Dicromato de potássio”. Os ensaios de toxicidade aguda ocorreram em condições controladas de laboratório, por 96 horas de exposição, sob sistema estático. Os juvenis de peso médio 1.02±0.06g, foram distribuídos em grupos (n=15), formados por triplicatas de 5 indivíduos por aquário para cada concentração da faixa de letalidade estabelecida: 2.5, 10, 15, 25 e 45 µg/L, e mais um controle (branco). Os dados de letalidade foram tratados pelo método de Trimmed Spearman-Kärber<sup>®</sup>, e por análises de Probito determinou-se a CL<sub>50-96h</sub> de 16.42 µg/L do clorpirifós para os juvenis de tambaqui. Efeitos rápidos e severos provocaram a morte dos animais em 48h de ensaio, e alterações comportamentais foram observadas até 96h de exposição. Antes de induzir a morte nos animais, este pesticida provocou em todas as concentrações, algumas mudanças de comportamento como: batimento opercular acelerado, nado contínuo, respiração na superfície, perda de equilíbrio natatório, natação errática, paralisia, espasmos, convulsão, e outros. As análises metodológicas qualitativas/quantitativas exploratórias destes efeitos comportamentais, demonstraram possível relação de concentração-resposta. Os resultados permitem sugerir que, o pesticida clorpirifós demonstrou-se muito tóxico para peixes, e representa grande ameaça para a sobrevivência da biota de ambientes aquáticos.

**Palavras-chave:** *Colossoma macropomum*. Clorpirifós. Toxicidade Aguda.

## ABSTRACT

Assessing the toxicity of pesticides used in temporary crops for aquatic organisms allows to elucidate newly installed or aggregated disturbances over time. Thus, this ecotoxicological study aimed to evaluate the acute toxicity of the 48% chlorpyrifos pesticide (Klorpan® 480EC) in order to determine the mean lethal concentration (LC<sub>50-96h</sub>) for tambaqui (*Colossoma macropomum*) fingerlings. Toxic sensitivity of the test organism was preliminarily assessed using the reference substance “potassium dichromate”. Acute toxicity tests were performed under controlled laboratory conditions for 96 hours of exposure under static system. The medium weight of juveniles was  $1.02 \pm 0.06\text{g}$  were distributed in groups (n = 15), formed by triplicates of 5 individuals per aquarium for each concentration of the established lethality range: 2.5, 10, 15, 25 and 45  $\mu\text{g} / \text{L}$ , plus one control (white). The lethality data were processed by the Trimmed Spearman-Kärber® method, which by Probito analyzes determined the LC<sub>50-96h</sub> of 16.42  $\mu\text{g} / \text{L}$  of the chlorpyrifos for tambaqui juveniles. Fast and severe effects caused the animals to die within 48h of the test, and behavioral changes were observed up to 96h of exposure. Prior to inducing death in animals, this pesticide caused some behavioral changes at all concentrations, such as: accelerated operculum movement, continuous swimming, surface breathing, loss of swimming balance, erratic swimming, paralysis, spasms, seizures, and others. The Exploratory qualitative / quantitative methodological analyzes of these behavioral effects demonstrated a possible concentration-response relationship. The results suggest that the chlorpyrifos pesticide has been shown to be very toxic to fish, and poses a major threat to the survival of aquatic biota.

**Keywords:** *Colossoma macropomum*. Chlorpyrifos. Acute Toxicity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Processos de contaminação aquática por pesticidas lançados no meio ambiente.....	19
Figura 2 - Quantidade de soja produzida pelos dez municípios com maior produção do estado do Pará, no ano de 2016, em toneladas. Estão entre estes, os municípios de Belterra, Mojuí dos Campos e Santarém.....	22
Figura 3 - Fórmula estrutural química geral dos organofosforados (OF). X= O, S ou Se; R1; R2=alquil, aril, SR'ou OR'; L=halogênios, alquil, aril ou heterocíclicos, incluindo o grupo fosforil (P=O), ou tiofosforil (P=S), e os grupos lipofílicos (arilas ou aquilas) que são R1 e R2, e o grupo L de saída.....	22
Figura 4 - Esquema de transmissão da sinalização sináptica colinérgica. A: Acetil; CoA: Coenzima A; Ch: Colina; ACh: Acetilcolina; AChE: Acetilcolinesterase; ChAT ou CAT: Colina Acetiltransferase; VACHT: Transportador vesicular de ACh; mAChR: Receptor muscarínico; nAChR: Receptor Nicotínico.....	26
Figura 5 - Exemplar juvenil de <i>Colossoma macropomum</i> (CUVIER, 1818) .....	39
Figura 6 - Esquema ilustrativo da aplicação do teste de toxicidade aguda (96h) em aquário.....	43
Figura 7 - Esquema ilustrativo da diluição do pesticida clorpirifós para a aplicação do teste de toxicidade aguda (96h) .....	44
Figura 8 - Curva da concentração média letal do dicromato de potássio para 50% da população de juvenis, apresentando o limite superior e inferior do intervalo de confiança (95%). Desvio (S)= 0.51; R= 0.99.....	47
Figura 9 - Curva da concentração média letal do pesticida clorpirifós para 50% da população de juvenis, apresentando o limite superior e inferior do intervalo de confiança (95%). Desvio (S)= 0.38; R= 0.98.....	49
Figura 10 - Imagem ilustrativa sobre as divisões imaginárias da coluna d'água no aquário.....	54
Figura 11 - Morfologia natatória do <i>Colossoma macropomum</i> (CUVIER, 1818) .....	55
Figura 12 - Gráfico representando o quantitativo de indivíduos expostos ao pesticida clorpirifós que manifestaram episódios rápidos de paralisia, demonstrando efeitos associados à exposição aguda até as 96 horas.....	65
Figura 13 - Gráfico representando o quantitativo de indivíduos expostos ao pesticida clorpirifós que manifestaram episódios de espasmos, demonstrando efeitos associados à exposição aguda até as 96 horas.....	66
Figura 14 - Gráfico representando o quantitativo de indivíduos expostos ao pesticida clorpirifós que manifestaram episódios de convulsão (do tipo tônica ou clônica), demonstrando efeitos associados à exposição aguda até as 96 horas.....	67
Figura 15 - Gráfico representando a soma do quantitativo de indivíduos que manifestaram em 96 horas de exposição pelo menos um dos episódios expostos nos estágios de nº 5 da tabela 8, indicando a latência para atingir os sintomas que se assemelham à convulsão. Os sintomas apresentados: paralisia, espasmos e convulsão (tônica ou clônica) estão associados ao tóxico que podem ser relacionados aos efeitos convulsivos em peixes.....	69

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Informações sobre as propriedades físico-químicas do pesticida clorpirifós.....	31
Tabela 2 - Média dos valores dos parâmetros físico-químicos da água durante o ensaio de toxicidade aguda com dicromato de potássio (96h) .....	46
Tabela 3 - Distribuição da mortalidade dos juvenis no Teste de Toxicidade Aguda com dicromato de potássio (96h) .....	46
Tabela 4 - Valores de CL <sub>50</sub> em Testes de Toxicidade Aguda com dicromato de potássio para espécies de peixes distintas.....	47
Tabela 5 - Distribuição da mortalidade de juvenis no Teste de Toxicidade Aguda com o pesticida clorpirifós (96h).....	48
Tabela 6 - Valores de CL <sub>50</sub> em Testes de Toxicidade Aguda do clorpirifós para espécies de peixes distintas.....	50
Tabela 7 - Média dos valores dos parâmetros físico-químicos da água durante o ensaio de toxicidade aguda com o pesticida clorpirifós (96h) .....	51
Tabela 8 - Descrição do padrão de estar dos juvenis na coluna d'água quando encontram-se dispostos em aquário.....	54
Tabela 9 - Descrição do padrão de natação (equilíbrio e deslocamento) dos juvenis na coluna d'água quando encontram-se em aquário.....	56
Tabela 10 - Descrição de interações agonistas dos juvenis na coluna d'água quando encontram-se em aquário.....	57
Tabela 11 - Eventuais estágios comportamentais dos juvenis de tambaqui frente à exposição ao dicromato de potássio durante o Teste de Sensibilidade (96h) .....	58
Tabela 12 - Eventuais estágios comportamentais dos juvenis de tambaqui frente à exposição ao pesticida clorpirifós durante o Teste de Toxicidade Aguda (96h) .....	60
Tabela 13 - Manifestação dos efeitos ( <i>scores</i> ) comportamentais em 96 horas de exposição aguda ao pesticida clorpirifós no presente estudo.....	62

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

A — Acetil

ABNT — Associação Brasileira de Normas Técnicas

ABRASCO — Associação Brasileira de Saúde Coletiva

ANVISA — Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Ach — Acetilcolina

AChE — Acetilcolinesterase

ASTM — American Society for Testing and Materials

Ch — Colina

ChAT ou CAT — Colina Acetiltransferase

CL — Concentração Letal

CoA — Coenzima A

CONAMA — Conselho Nacional de Meio Ambiente

CPF — Clorpirifós

DEFT — Dietilfosforotioato

DL — Dose Letal

DNA — Ácido Desoxirribonucleico

DP — Dicromato de Potássio

EC — Concentrado Emulsionável

EM — Micro Emulsão

IBGE — Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

*i.e* — isto é

*i.a* — ingrediente ativo

IgM — Imunoglobulina M

MAPA — Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

EM — Micro Emulsão

*Escores* — Pontuações

MS — Ministério da Saúde

MN — Micronúcleo

O — Oxigênio

OCDE — Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

OMS — Organização Mundial de Saúde

P — Fósforo

PTZ — Pentilenotetrazol

pH — Potencial Hidrogeniônico

Rod — Rodovia

S — Enxofre

Se — Selênio

SINAN — Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SINITOX — Sistema Nacional de Informação Tóxico-Farmacológicas

SNC — Sistema Nervoso Central

SNP — Sistema Nervoso Periférico

TCPy — 3, 5, 6-tricloro-2-piridinol

USEPA — Agência Nacional de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

vAChT — Transportador Vesicular

mAChR — Receptor Muscarínico

nAChR — Receptor Nicotínico

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>17</b>
2.1	PESTICIDAS.....	17
2.2	O USO DE PESTICIDAS NO BRASIL.....	18
2.3	PESTICIDAS EM AMBIENTES AQUÁTICOS.....	19
2.4	CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA POR PESTICIDAS NA AMAZÔNIA.....	20
2.5	ATIVIDADES DE MONOCULTURAS E O USO DE PESTICIDAS NO MUNICÍPIO DE SANTARÉM-PARÁ, AMAZÔNIA, BRASIL.....	21
2.6	A UTILIZAÇÃO DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS E A SUA TOXICIDADE.....	22
2.7	TESTES DE TOXICIDADE PARA AVALIAÇÃO DE CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA.....	27
2.8	COMPORTAMENTO DE PEIXES COMO INDICADOR DE TOXICIDADE AQUÁTICA.....	28
2.9	O USO DO PESTICIDA CLORPIRIFÓS E SUA TOXICIDADE SOBRE O COMPORTAMENTO DE PEIXES COMO ORGANISMOS NÃO-ALVO.....	31
2.10	CHARACIDAE – <i>COLOSSOMA MACROPOMUM</i> (CUVIER, 1818) COMO ORGANISMO MODELO PARA AVALIAÇÃO DE CONTAMINANTES.....	35
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>36</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
4.1	GERAL.....	38
4.2	ESPECÍFICOS.....	38
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
5.1	ANIMAIS.....	39
5.2	ACLIMATAÇÃO.....	39
5.3	CONDIÇÕES DE APLICAÇÃO DOS ENSAIOS DE TOXICIDADE NO LABORATÓRIO.....	40
5.4	APLICAÇÃO DO TESTE DE TOXICIDADE AGUDA UTILIZANDO A SUBSTÂNCIA REFERÊNCIA DICROMATO DE POTÁSSIO PARA AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE TÓXICA DA ESPÉCIE.....	42

5.5	APLICAÇÃO DO TESTE DE TOXICIDADE AGUDA UTILIZANDO O PESTICIDA CLORPIRIFÓS PARA AVALIAÇÃO DE SEU POTENCIAL TÓXICO PARA A ESPÉCIE.....	43
5.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>45</b>
6.1	SENSIBILIDADE DO TAMBAQUI PARA O DICROMATO DE POTÁSSIO - 96H.....	45
6.2	TOXICIDADE AGUDA DO PESTICIDA CLORPIRIFÓS PARA O TAMBAQUI - 96H.....	48
6.3	CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA ÁGUA NO ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA COM CLORPIRIFÓS.....	51
6.4	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CLORPIRIFÓS NO COMPORTAMENTO, DURANTE OS ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA.....	53
6.4.1	<b>Etograma para a espécie <i>Colossoma macropomum</i> com repertórios de comportamentos observados em aquários isentos de tóxico.....</b>	<b>53</b>
6.4.2	<b>Efeitos do dicromato de potássio sobre o comportamento de tambaqui em 96h de exposição.....</b>	<b>58</b>
6.4.3	<b>Efeitos do clorpirifós (48%) sobre o comportamento de tambaqui em 96h de exposição.....</b>	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>71</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>72</b>
	<b>ANEXOS</b>	



## 1 INTRODUÇÃO

Os sistemas aquáticos constituem os principais receptáculos de contaminantes resultantes das ações antrópicas, o que gera grande ameaça à saúde do meio ambiente (DEB e DAS, 2013; SUNANDA *et al.*, 2016). Grande parte dos impactos ecológicos de ações antrópicas que afetam os sistemas de água doce, têm suscitado o declínio e perda acentuada de biodiversidade, pois em muitos casos, há o desaparecimento de espécies antes mesmo de serem sequer conhecidas e/ou estudadas (BARTHEM e FABRÉ, 2002).

O homem está sujeito a sofrer contaminação ambiental por resíduos desses toxicantes, através de absorção por praticamente todas as vias de exposição (dérmicas, respiratórias e gastrointestinais), onde a ingestão de alimentos e água contaminados são os principais meios dessa contaminação (LINHARES, 2014; SILVA, 2015). Segundo Moreira *et al.*, (2014), a utilização de pesticidas pelos produtores nas atividades de agriculturas no Brasil é muito intensa, isto vale para o controle ou combate, tanto de ervas daninhas como de insetos e outras pragas que ameaçam seus cultivos. Ademais, estudos toxicológicos utilizando animais como peixes, focas, golfinhos e, aves, têm demonstrado a importância desses animais para elucidar efeitos na saúde ambiental sobre diferentes populações (BRASIL, 2015).

Com o intuito de se obter informações precoces sobre possíveis danos provocados por esses xenobióticos em organismos não alvo, existem estratégias relevantes de estudos que incluem o uso de bioindicadores e marcadores diversificados de efeitos (MAGALHÃES e FERRÃO FILHO, 2008). Para estes autores, há necessidade em se estudar particularmente ecossistemas locais, a fim de se buscar com mais clareza alternativas de proteção e conservação das espécies nativas ameaçadas.

Existem áreas onde a contaminação de águas adjacentes à lavouras tem sido monitorada através do uso de peixes como bioindicadores (SPADOTTO *et al.*, 2004). De acordo com estes autores, esses indivíduos são capazes de “transparecer” suas próprias situações toxicológicas, e também a de outros organismos da biota aquática. Vários trabalhos reportam a toxicidade de diferentes classes de pesticidas como, inseticidas, piretróides e herbicidas, para diferentes organismos não-alvo (CHAPADENSE *et al.*, 2009; MOURA, 2009; ROCHA 2009; ASSIS *et al.*, 2010; ARANHA, 2013; KOCHANN, *et al.*, 2013; CUNHA, 2014; YASEEN *et al.*, 2019).

Zagatto e Bertolletti (2008), salientam que a temperatura é considerada um fator de grande influência tóxica de substâncias isoladas ou fontes de contaminação nos diferentes locais e/ou regiões do Brasil. Nos trópicos são poucas ou nenhuma as informações sobre os efeitos nocivos dessas substâncias, comparando às regiões onde o clima é temperado. Porém, vários estudos têm voltado preocupação para os ecossistemas tropicais (MARTINEZ e CÓLUS, 2002; GUNNARSSON e CASTILLO, 2018). Segundo Souza (2014), as condições sazonais dos ambientes amazônicos pode influenciar no comportamento dessas moléculas, e isso suscita atenção de estudos futuros.

Segundo Malabarba *et al.*, (1998), essas regiões possuem grande importância ecológica, pois abrigam e sustentam uma grande biomassa de peixes, nos canais de rios, lagos, riachos, e outros, onde muitas dessas espécies possuem exploração para fins comercial ou de subsistência. Os principais representantes dessa diversidade, são da Ordem Characiforme (Caracídeos), seguido dos Siluriformes e Gymnotiformes, além disso, existem também os de menor escala mas não menos importantes, que são os Ciclídeos, Osteoglocídeos, Cyprinodontídeos e Poecilídeos (BAYLEY, 1981). Deb e Das (2013) e Sunanda *et al.*, (2016), salientam que, investigar a toxicidade de “estressores químicos” para os peixes se faz de grande relevância, pois, podem revelar perturbações precoces, e efeitos deletérios adversos que podem indicar sobre a saúde dos ecossistemas aquáticos.

Os trabalhos de ecotoxicidade para espécies de peixes de água doce no Brasil, são na maioria, publicações em que se utilizam modelos tradicionais como *Danio rerio*, e *Poecilia reticulata*, que são espécies introduzidas e muito usadas em bioensaios nas diferentes regiões do país (USEPA, 2002; ABNT, 2004). Em contrapartida, a ideia de que a sensibilidade dos peixes exóticos possuem semelhanças com os nativos de qualquer região vêm sendo estudada nas últimas décadas. Evidências literárias apontam diferenças significativas na tolerância entre espécies, e até mesmo entre indivíduos coespecíficos, para substâncias isoladas ou múltiplas (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 PESTICIDAS

Agrotóxicos, agroquímicos, praguicidas, pesticidas, defensivos agrícolas, e biocidas, são alguns dos nomes usados para se referir aos venenos agrícolas, que beneficiam diversos setores da agricultura temporária e permanente (FELIPPE, 2017). O termo “pesticidas” é usado internacionalmente, de forma correlata com a etimologia literária anglo-saxônica, na intenção de englobar maior parte dessas substâncias (MORAGAS e SCHNEIDER, 2003). Vários autores defendem a utilização unificada da terminologia “biocidas”, emitindo se tratar de agentes químicos que eliminam vidas e, não somente os organismos alvo; além de que, seus riscos se estendem desde a produção até o processo de armazenagem (MORI, 2006; LINHARES, 2014; FELIPPE, 2017). No Brasil, o termo “agrotóxicos”, criado para designar esses produtos tóxicos, está apoiado na legislação atual 7802/1989.

De acordo com a ANVISA (Agência de Vigilância Sanitária), os agrotóxicos são classificados para os organismos-alvo (*i.e.* herbicidas para ervas-daninhas, fungicidas para fungos, inseticidas para insetos, raticidas para ratos, dentre outros). Sua estrutura química é inorgânica (chumbo, cobre, cádmio, mercúrio, entre outros), orgânica de síntese (carbamatos, nitrogenados, clorados, fosforados, clorofosforados), e orgânica vegetal (piretrina, nicotina). Ademais, adota-se a classificação desses compostos pelas faixas toxicológicas letais (extrema, alta, moderada, e pouco tóxica), e por periculosidade ambiental (extrema, alta, moderada, e pouco perigosa) (BRASIL, 2016).

O uso de pesticidas no mundo chega em média a 2 milhões de toneladas anuais, e supera essas estimativas a cada ano (ABHILASH e SINGH, 2009). No decênio entre 2000/2010, o Brasil superou em larga escala o comércio mundial, chegando a atingir 190% de aumento contra 93% do resto do mundo (FELIPPE, 2017). De acordo com relatos do “Dossiê da Abrasco” (2015), este patamar de consumo vem consolidando o Brasil como um gigante mundial no uso de agrotóxicos. A mais de uma década, o país, superou os Estados Unidos e se tornou o maior consumidor desses produtos na atualidade (NAIME, 2017; FELIPPE, 2017).

A grande problemática desse impulso vigora em razão de que, países menos desenvolvidos possuem dados alarmantes de intoxicações agudas por agrotóxicos (cerca de 70 mil/ano), e isso se deve principalmente à precariedade de higiene, aliado a falta de estudos e/ou

informações por parte da população (CHOWDHARY, BHATTACHARYYA e BANERJEE, 2014; SILVA, 2015).

Esses agentes químicos são reportados como causadores de diversos males sobre a saúde (CASSAL *et al.*, 2014), como exemplo: mal formação congênita (FELIPPE, 2017), infertilidade e disfunção endócrina (LINHARES, 2014), depressão (SIQUEIRA *et al.*, 2019), imunossupressão do sistema imunológico como causa de suscetibilidade a outras enfermidades (SILVA, 2015), e doenças mutagênicas como câncer (INCA, 2015).

## 2.2 O USO DE PESTICIDAS NO BRASIL

O Brasil é detentor de um estimado potencial de agricultura e pecuária, com extensas áreas de plantios e criação de rebanhos, onde o modelo de produção é conciliado com o uso compulsivo de pesticidas (DE DEUS e BANKONIY, 2012). Em virtude de vários fatores que ameaçam os plantios como, insetos, fungos, dentre outras variedades de pragas, além da competitividade da vegetação nativa, é que os agricultores recorrem ao uso abusivo desses “defensivos agrícolas” para defender suas produções (WAICHMAN, 2008).

Segundo o “Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos”, no biênio de 2013/2014 os agrotóxicos organofosforados tiveram maior comercialização no mercado brasileiro, e os mais vendidos foram: glifosato, atrazina, 2,4-D, óleo mineral, acefato, metomil, clorpirifós, dicloreto de paraquate, carbendazim, e ametrina (BRASIL, 2016). Em contrapartida, o elevado consumo dessas moléculas, têm gerado graves riscos para a saúde, referentes a casos de intoxicações incluindo mortes, tanto no meio rural quanto urbano (SILVA, 2015; NAIME, 2017). Atualmente, estima-se que, pelo menos 400 mil pessoas/ano no Brasil são atingidas por intoxicações com agrotóxicos organofosforados, e cerca de 4 mil desses casos “evoluem” para mortes (BRASIL, 2016).

De acordo com a OMS (Organização Mundial de Saúde), de 1975 a 1990, o número de pessoas intoxicadas por agrotóxicos passou de 500 mil/ano para 3 milhões/ano, ademais, cerca de 220 mil casos de mortes foram relatados, além dos casos subnotificados e notificados que não são admitidos nas notificações. Segundo a OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico), foram admitidos mais de 25 milhões/ano de casos de intoxicações ocupacionais por pesticidas neste mesmo período, nos países em desenvolvimento (CUNHA, 2007).

Os dados de intoxicações agudas por agrotóxicos que foram notificados junto ao SINAN (Sistema de Informações de Agravos de Notificação), nos anos de 2007 a 2013, são apontados como a maioria dos casos de saúde ocupacional, acidental e tentativas de suicídio, provocados por pesticidas organofosforados (FELIPPE, 2017). Nos dados de intoxicações emitidos pelo SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico - Farmacológicas), no ano de 2013, o número de casos no Brasil foi de 42 mil, sendo 2.804 mil provocados por agrotóxicos, sendo 209 mortes ocasionadas por estes, correspondendo a maior parte dos óbitos registrados por intoxicações (NAIME, 2017).

### 2.3 PESTICIDAS EM AMBIENTES AQUÁTICOS

O uso intensivo de pesticidas em áreas agrícolas resulta na contaminação das águas superficiais e subterrâneas dos corpos hídricos adjacentes, diminuindo assim a sobrevivência dos organismos não alvo que compõem as biotas dos ecossistemas aquáticos (SUNANDA *et al.*, 2016).

Ao serem lançados na natureza, esses compostos apolares podem percorrer várias rotas até atingir os corpos d'água (Figura 1), e seus resíduos podem vir a alcançar o homem através da ingestão de alimentos e águas contaminadas (LINHARES, 2014).

**Figura 1** - Processos de contaminação aquática por pesticidas lançados no meio ambiente.



Fonte: Assis (2008)

As características físico-químicas das moléculas apolares, aliadas às condições ambientais podem influenciar diretamente no carreamento destas através de diversos processos como: lixiviação ou escoamento superficial do solo, e infiltrações para os lençóis freáticos (MARTINEZ e CÓLUS, 2002).

Ademais, pode haver deposição em sedimentos ou associação com partículas suspensas nos cursos d'água, conduzindo a reações, que podem atenuar ou potencializar seus efeitos deletérios sobre o meio aquático (NIMMO, 1985). Outrossim, estas moléculas podem ser incorporadas por bactérias, plânctons, macrófitas, microcrustáceos, peixes e entre outros organismos não-alvo, levando ao acúmulo de resíduos nos diferentes níveis da cadeia trófica aquática (TOMITA e BEYRUTH, 2002).

#### 2.4 CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA POR PESTICIDAS NA AMAZÔNIA

A maior bacia hidrográfica do mundo localiza-se na Região Amazônica (JUNK, 1983; SIOLI, 1985). Para tanto, esta conta com diversas redes de malhas hídricas, com grandes mosaicos hídricos que irrigam e contribuem para a sua formação, além de incontáveis pequenos corpos d'água de extrema importância para a sua regulação e manutenção funcional dos ecossistemas aquáticos regionais, entre estes estão, igapós, riachos (igarapés), e córregos de várzea ou terra firme (MALABARBA *et al.*, 1998; SANTOS e FERREIRA, 1999).

A sazonalidade anual amazônica exibe uma peculiaridade caracterizada por período seco ou verão amazônico (de julho a outubro), e por período chuvoso (de dezembro a maio), durante esses diferentes períodos, ocorrem as vazantes e cheias dos grandes rios, que passam a restringir água para seus leitos, e/ou acontece a inundação de grandes áreas como várzeas e igapós (MITCHELMORE e CHIPMAN, 1998). Esse ciclo interfere diretamente na vida das comunidades nativas, e sobretudo das ictiofaunas, pois esta região possui uma parcela significativa de diversidade de espécies e abundância, tidas como fontes de alimento ou renda para os povoados locais (MALABARBA *et al.*, 1998).

Os venenos agrícolas estão atingindo as águas dos ecossistemas amazônicos. Conforme pesquisas informam que os ambientes aquáticos dessas regiões vêm sofrendo com a contaminação dessas moléculas, sobretudo de produtos organofosforados, incluindo o pesticida clorpirifós (SOUMIS, ROULET e LUCOTTE, 2000; SOUMIS *et al.*, 2003; SOUZA, 2014; LUIS PIRES, 2015). Soumis *et al.*, (2003) confirmam a presença residual em músculos de

peixes pescados em região amazônica, e Luiz Pires (2015) em amostras de água coletadas de trechos de rios. Nesse cenário, os pesticidas são bastante usados nas agriculturas, pecuárias, sendo os organofosforados preferidos por produtores e para uso doméstico (SOUMIS, ROULET e LUCOTTE, 2000). E segundo Chen *et al.*, (2014), o clorpirifós possui destaque de uso dentre os diversos pesticidas existentes na atualidade, por ser um produto adquirido por baixo custo e possuir alta eficiência.

## 2.5 ATIVIDADES DE MONOCULTURAS E O USO DE PESTICIDAS NO MUNICÍPIO DE SANTARÉM- PARÁ, AMAZÔNIA, BRASIL

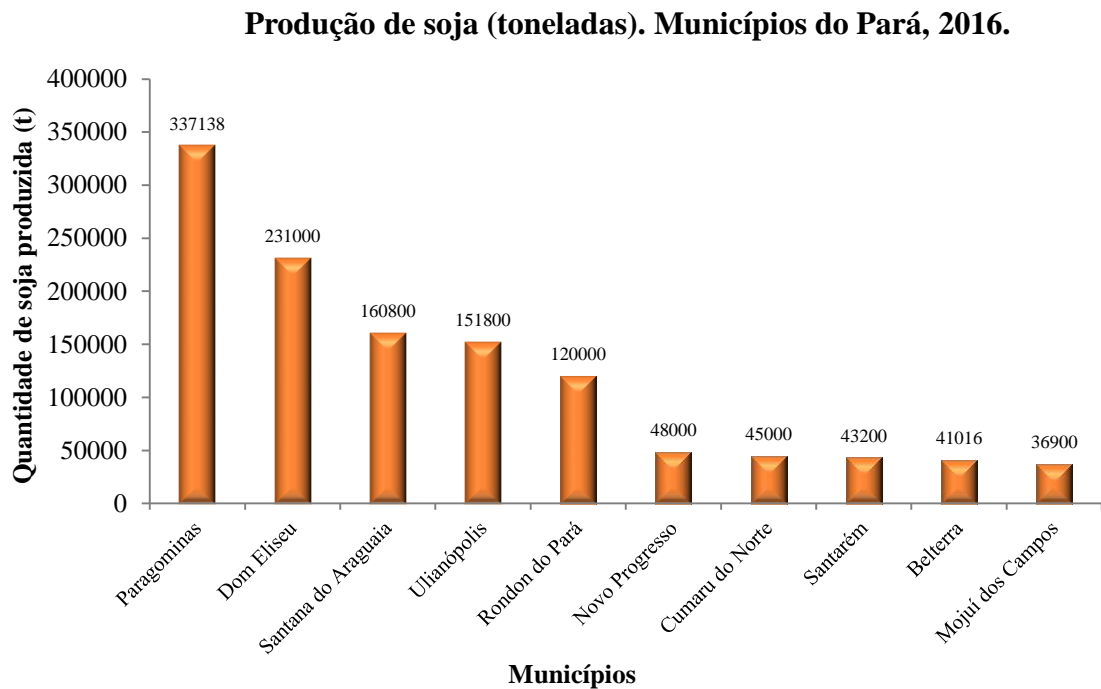
A expansão da agricultura tem experimentado um importante avanço nas fronteiras agrícolas localizadas ao norte do Brasil, e a produção de grãos tem esboçado valores consideráveis. No final da década de 1990, a implantação da agricultura graneleira mecanizada na região Oeste do Pará, se deu com a produção de grãos (principalmente a sojicultura), primeiramente nos municípios de Belterra, Santarém e, Mojuí dos Campos, para depois se expandir às demais localidades (VENTURIERI *et al.*, 2007).

A soja continua sendo a monocultura mais importante da atualidade (BARTHEM e FABRÉ, 2004; SANTOS, 2015; ANDRADE, 2016), e a lavoura temporária mais intensivamente praticada na Amazônia brasileira. Essas lavouras comumente são “defendidas” pelos produtores através da utilização massiva de pesticidas, fertilizantes, dentre outros (OLIVEIRA, SANTANA e HOMMA, 2013). Ainda, segundo este autor, as estratégias sustentáveis como o plantio direto, existem raramente nessas regiões.

Santarém-PA, é um dos municípios que tem se destacado como importante polo regional de agricultura do Pará e do Brasil, porque nessa região, existem condições favoráveis para a produção e o escoamento, como: grandes áreas de terras, porto estratégico (da empresa CARGILL), e vias pavimentadas (Rod. BR-163) que liga sul ao norte do Brasil, além de hidrovias (CARDOSO, 2006; ARTUZO *et al.*, 2018).

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (BRASIL, 2017), estes municípios apresentam forte setor de produção de soja, pois destacam-se entre os maiores produtores do estado do Pará. A figura 2, mostra a produção de soja (toneladas) pelos dez municípios do estado do Pará que mais produziram esse grão no ano de 2016.

**Figura 2** - Quantidade de soja produzida pelos dez municípios com maior produção do estado do Pará, no ano de 2016, em toneladas. Estão entre estes, os municípios de Belterra, Mojuí dos Campos e Santarém.

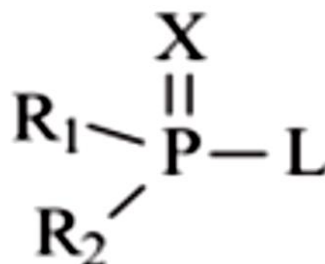


**Fonte:** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2017)

## 2.6 A UTILIZAÇÃO DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS E A SUA TOXICIDADE

Os pesticidas organofosforados são moléculas derivadas de ácidos fosfóricos (fosfônicos, fosfotióicos e fosfonotióicos), que geralmente apresentam baixa solubilidade e são detentoras de alta lipofilicidade (CAVALCANTI *et al.*, 2016). Além de que, normalmente tornam-se mais hidrolisáveis e menos precipitadas em ambientes alcalinos (LINHARES, 2014).

**Figura 3** - Fórmula estrutural química geral dos organofosforados. X= O, S ou Se; R1; R2=alquil, aril, SR' ou OR'; L=halogênios, alquil, aril ou heterocíclicos, incluindo o grupo fosforil (P=O), ou tiofosforil (P=S), e os grupos lipofílicos (arilas ou aquilas) que são R1 e R2, e o grupo L de saída.



**Fonte:** Linhares (2014)



Essa classe de pesticidas foi descoberta no fim da década de 1930, e a partir de então, vários desses produtos passaram a ser produzidos em massa (milhares de toneladas) pela indústria química (TOY, 1976). Durante a Segunda Guerra Mundial, quando esses compostos vieram a ser utilizados como arma química “militarizada”, foram apelidados de “agentes nervosos” (KING e AARON, 2015). A partir da década de 1970 os organofosforados passaram a substituir, dentre outras classes, os compostos organoclorados, tendo em vista a baixa persistência ambiental que estes oferecem (SANTOS *et al.*, 2007).

No âmbito da toxicocinética, a compreensão sobre o metabolismo desta classe de pesticidas é muito importante para especificar tratamentos, dentre outros fins (LINHARES, 2014). No processo de biotransformação que acontece primariamente no fígado, essas moléculas podem sofrer “destoxificação” em até 48 horas, e por excreção urinária serem eliminadas como metabólitos considerados não tóxicos, o TCPy (3,5,6-tricloro-2-piridinol), e o DEFT (dietilfosforotioato) (EATON *et al.*, 2008). Por outro lado, podem sofrer “dessulfuração”, formando metabólitos do tipo oxon que são altamente ativos no meio biológico pois formam radicais livres, mas também podem sofrer degradação pelo organismo e serem eliminados fisiologicamente (TESTAI, FRANCA e DI CONSIGLIO, 2010; NAIME, 2017). Desse modo, pela dupla ligação fosfatídica, estas moléculas químicas, formam ligações “oxon” com átomos de oxigênio, do tipo fosfato (P=O), ou “tion” com átomos de enxofre, do tipo fosforotioato (P=S) (VALE, 1998).

Vale enfatizar, que o metabólito TCPy antes considerado menos tóxico de que o seu composto de origem, teve traços toxicológicos (hepatotóxico e nefratóxico) de seus componentes, após 48 horas de exposição, revelados em camundongos, conforme afirma o estudo de Deng *et al.*, (2016). Nessa vertente, tanto o composto original como seus metabólitos são denominados de alto risco para o meio ambiente, incluindo animais e plantas (EFSA, 2014; KOPJAR *et al.*, 2017).

A maioria das moléculas organofosforadas possui propriedades com lipossolubilidade contribuinte para uma rápida absorção pelas membranas celulares dos organismos (HODGSON, 2012). Alguns são muito lipofílicos (clorpirifós, diazinon, temefós, malation, paration, metil-paration, fention, cumafós, dimetoato, etion e o sulfotepp) (LINHARES, 2014). Devido à alta lipofilicidade, se ingeridos, podem sofrer deposição nos tecidos gordurosos de organismos não alvo. Ademais, podem atravessar facilmente a barreira hematoencefálica (TESTAI, FRANCA e DI CONSIGLIO, 2010; FELIPPE, 2017), e a barreira placentária, podendo estar presentes na placenta, no cordão umbilical, e possivelmente, no feto (GUPTA, 2006).

Sabe-se que seus efeitos, se caracterizam, por provocar primariamente a “síndrome colinérgica” pela hiperestimulação colinérgica no organismo (SILVA, 2015). Essa superestimulação desencadeia vários sintomas como: broncorreia, desequilíbrio, depressão respiratória, alterações comportamentais, fasciculação cardíaca e musculoesquelética, convulsões, e morte (LINHARES, 2014). Assim, devido a ACh ser atuante nos sistemas nervoso central (SNC) e periférico (SNP), essa superestimulação provoca uma série de sinais e sintomas que podem caracterizar a intoxicação aguda como “síndrome ou crise colinérgica” (CAVALCANTI *et al.*, 2016). De acordo com Souza (2014), todos os pesticidas modernos possuem ação neurotóxica, contudo, vale sobressaltar, que efeitos não colinérgicos como o estresse oxidativo, respiratório e cardíaco, também são objetos de investigações sobre a saúde em condições experimentais (MEYER, 2005; FELIPPE, 2017; NAIME, 2017).

Apesar desta classe de substâncias químicas ser considerada de baixa persistência ao longo das cadeias tróficas, ressalta-se que pesquisas vêm revelando efeitos deletérios, em organismos aquáticos não alvo, provocados por esses xenobióticos, que expõem os organismos à estresses de alterações morfológicas, comportamentais, oxidativas, bioquímicas, histopatológicas, hematológicas, reprodutoras, além de desenvolvimento (SUNANDA *et al.*, 2016). Muitos dos ingredientes ativos desses toxicantes (agrotóxicos) são classificados de baixa toxicidade, em virtude dos efeitos agudos pelos testes rápidos de DL<sub>50</sub> em ratos, mas, estes podem causar efeitos de estágios crônicos, que muitas vezes, podem levar meses, anos, ou ainda, décadas, para ser manifestados após a exposição (BRASIL, 2015).

A utilização indiscriminada de agentes organofosforados podem atingir os organismos alvo e não-alvo do mesmo modo, pois estes produtos costumam ser altamente tóxicos e, geralmente possuem amplo espectro (ABDEL HALHIM *et al.*, 2006; DEB e DAS, 2013; SUNANDA *et al.*, 2016). Assim, eventuais desordens colinérgicas, decorrentes da ação dos organofosforados, podem afetar as terminações nervosas e sinapses que contém transmissão nervosa pela ACh, bem como nas junções neuromusculares de vertebrados, onde estes atuam como neurotransmissores primários (SILVA, 2015).

A acetilcolina (ACh), encontra-se distribuída por todo o sistema nervoso, e destacadamente, está presente no cérebro, nas junções neuromusculares, nos gânglios dos sistemas nervosos simpático e parassimpático, além dos pós-gânglios das terminações nervosas parassimpáticas e simpáticas, esta última inerva vasos sanguíneos e glândulas

sudoríparas. Ademais, também existem nas terminações nervosas sensoriais e sinápticas não ganglionares supra-renal (COSTA *et al.*, 1988; LINHARES, 2014).

Esta biomolécula (ACh), tem um papel importante também na interação com outros neurotransmissores em circuitos cerebrais que regulam a função motora; o sono/vigília, a cognição (de aprendizagem, memória e atenção), respostas sensoriais e de nocicepção, além de excitação; os movimentos contráteis das musculaturas lisa e esquelética (POWER, VAZDARJANOVA e MCGAUGH, 2003; SARTER e PARIKH, 2005; JONES, BYUN e BUBSER, 2012).

Em termos de ação de receptor molecular, a ACh, ativa receptores de duas classes: nicotínicos e muscarínicos. Como exemplo, os receptores nicotínicos estão presentes nos gânglios autônomos e musculoesqueléticos; enquanto, os receptores muscarínicos estão presentes na musculatura lisa do miocárdio (regulando frequência dos batimentos cardíacos), da motilidade gástrica, e de glândulas exócrinas, entre outros locais (GUEVARA e PUEYO, 1995; VENTURA *et al.*, 2010).

Por sua vez, a acetilcolinesterase (AChE) é responsável pela rápida degradação da ACh nas sinapses colinérgicas e junções neuromusculares, modulando os impulsos nervosos da comunicação neuronal (LINHARES, 2014). Removendo, assim, o excesso desses neurotransmissores, e regulando a concentração destes na fenda sináptica (TÕUGU, 2006); sendo que, uma única molécula de AChE pode desativar até 300 mil moléculas de ACh por minuto (ASSIS, 2008). Por isso, na intoxicação por estes agentes químicos, a AChE é reconhecida como fator de maior relevância (FELIPPE, 2017).

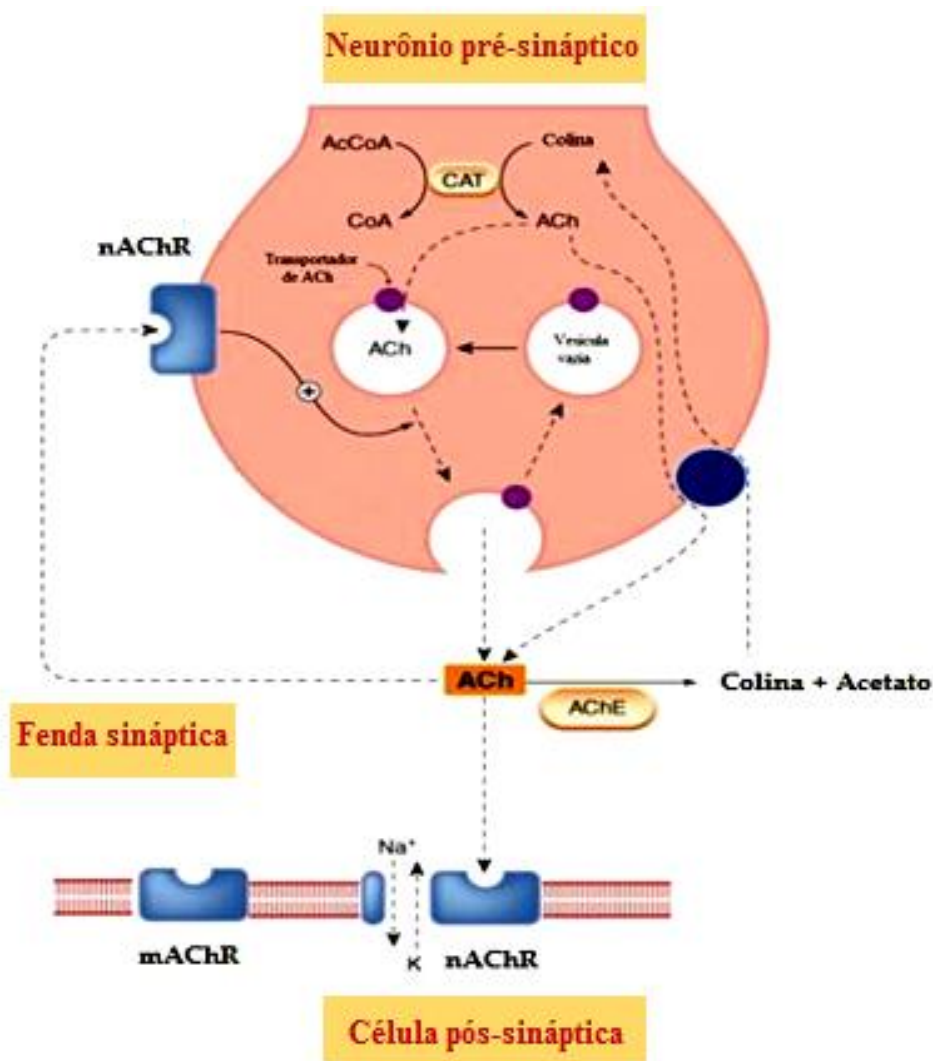
Algumas investigações utilizando marcadores para AChE em peixes, afim de monitorar pesticidas organofosforados e carbamatos no meio aquático, confirmaram que a Carpa comum - *Cyprinus Carpio* (RODRIGUES FUENTES e GOLD-BOUCHOT, 2000), Tilápia do Nilo - *Oreochromis niloticus* (CHANDRASEKARA e PATHIRATNE, 2005), e o Tambaqui - *Colossoma macropomum* (ASSIS, 2008, ASSIS *et al.*, 2010, CARVALHO *et al.*, 2014) são espécies com potencial para biomonitorar presença de alguns desses pesticidas.

Os neurotransmissores (ACh), são sintetizados no citoplasma do terminal axônico da célula pré-sináptica, e estocados nas vesículas sinápticas para maturação e liberação na fenda sináptica (LINHARES, 2014).

Como demonstrado no esquema da figura 4, na neurocomunicação colinérgica, o processo de liberação da ACh na fenda sináptica ocorre após a ativação dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$ , presente no neurônio pré-sináptico. A entrada destes íons sinaliza às vesículas do neurônio pré sináptico, que por sua vez, deslocam-se e se ancoram na membrana pré sináptica (terminal axônico), através das proteínas de ancoragem, e assim liberam as moléculas de acetilcolina.

Após a liberação, a ACh atravessa a fenda sináptica se liga a receptores colinérgicos (nicotínicos ou muscarínicos) presentes na membrana pós-sináptica, ativando suas vias de transdução do sinal da célula-alvo. Simultaneamente, a enzima AChE (específica da sinapse), se encarrega de fazer a hidrólise da ACh em colina e acetato (CARVALHO *et al.*, 2014).

**Figura 4** - Esquema de transmissão da sinalização sináptica colinérgica. A: Acetil; CoA: Coenzima A; Ch: Colina; ACh: Acetilcolina; AChE: Acetilcolinesterase; ChAT ou CAT: Colina Acetiltransferase; VAChT: Transportador vesicular de ACh; mAChR: Receptor muscarínico; nAChR: Receptor Nicotínico.



## 2.7 TESTES DE TOXICIDADE PARA AVALIAÇÃO DE CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA

A fim de conhecer e ampliar as informações acerca do passivo ambiental dos toxicantes que são lançados no meio ambiente pelo homem, bem como informar sobre a qualidade da água, e prever suas ameaças para a sobrevivência dos organismos vivos, é que são realizados os testes de toxicidade (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008). Com base na resolução N° 357 do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), estes bioensaios são imprescindíveis para avaliar os riscos das substâncias isoladas ou misturadas, sobre os sistemas aquáticos.

A ecotoxicidade das substâncias e os impactos que acontecem nos ambientes aquáticos pode afetar os organismos não alvo e causar intoxicações ecológicas que podem se manifestar nos diferentes níveis organizacionais de maior complexidade (FERREIRA, 2003). Neste sentido, Callisto *et al.*, (2004), salientam que os organismos vivos são capazes de prever perturbações no ambiente para diversas fontes de contaminações pontuais ou difusas. Por exemplo, os peixes, possuem grande relevância nesse sentido, principalmente por apresentarem várias vias de exposição como, a superfície corporal, branquial, sensoriais, gástricas, cavidade oral e trato gastrointestinal (SOUZA, 2014; ASSIS, *et al.*, 2010; MATAQUEIRO, 2002).

Diversos autores, sobressaltam a importância de testes com organismos modelos, para a elucidação de possíveis efeitos sobre a saúde ambiental, haja vista que, os toxicantes pode atingi-los diretamente em seus habitats (MAGALHÃES e FERRÃO-FILHO, 2008; ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008; AMORIM, 2014; SOUZA, 2014). Assim também, Callisto *et al.*, (2004), citam a importância dos bioindicadores em ensaios de toxicidade, incluindo as relações de efeitos para espécies, populações, comunidades, considerando a presença, abundância e distribuição destes organismos no cenário dos impactos. Além de que, estes organismos apresentam baixa tolerância e sensibilidade representativa para os mais diversos toxicantes (LOMBARDI, 2004).

Nos bioensaios realizados em ambiente laboratorial, geralmente são usados modelos *in vivo* recomendados por referências de competência internacional, como a USEPA, OCDE, e a ASTM (CALLISTO *et al.*, 2004). Comumente são organismos que representam diferentes organizações da biota aquática (*Daphnia magna* (microcrustáceo), *Danio rerio* (peixe), ouriço do mar, algas, entre outros), e que apresentam critérios e requisitos como a facilidade de obtenção, e manutenção nas diferentes fases do ciclo de vida, a que se deseja estudar (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

A maioria desses ensaios são embasados em avaliações experimentais de toxicidade aguda e crônica para substâncias tóxicas e efluentes (LOMBARDI, 2004). Os ensaios agudos são precedentes, e servem de base para os outros estudos simultâneos, que avaliam respostas subletais, como os testes de toxicidade crônica ou de avaliações para riscos ecotoxicológicos (SOUZA, 2014). Os dados de mortalidade determinam a concentração ou dose média letal ( $CL_{50}$  ou  $DL_{50}$ ) como resposta rápida e severa no período de 24 a 96 horas, podendo levar horas ou dias de avaliações, mas o tempo maior de exposição aguda em sistemas aquáticos é de 96 horas.

Todavia, os testes de toxicidade crônica avaliam respostas toxicológicas resultantes de múltiplas exposições e por períodos mais prolongados, em concentrações ecologicamente relevantes (ROCHA, 2009). As doses seguras comumente utilizadas nestes ensaios, são estabelecidas relativamente abaixo da faixa determinada com as concentrações nominais de letalidade para 50% dos animais (*i.e.* menores que a  $CL_{50}$ ) (FERREIRA, 2003). Contudo, as respostas em concentrações subletais, por períodos prolongados, podem se assemelhar às respostas por exposição em doses altas por períodos curtos, onde a diferença se estabelece no tempo para a manifestação dos sinais observados (HELLAWELL, 1998).

## 2.8 COMPORTAMENTO DE PEIXES COMO INDICADOR DE TOXICIDADE AQUÁTICA

Estudos etológicos de biomonitoramento possuem enorme importância na ecotoxicologia, isso se dá principalmente pela extrema sensibilidade de percepção fisiológica que esses organismos possuem frente à perturbações no ambiente (HELLOU, 2011). As respostas intrínsecas a situações alheias, estimuladas por ações/reações conjuntas, podem ser interpretadas como comportamento e, estes estímulos podem ser mediados por fatores internos (moleculares), ou fatores externos (físicos e/ou ecológicos) (SCOTT e SLOMAN, 2004). Essas respostas são dependentes de condicionantes a que o organismo está confinado/exposto. Ou seja, são influenciadas pelo meio, e são essas variáveis que determinam a vitalidade do organismo (LITTLE *et al.*, 1990).

Segundo Faucher *et al.*, (2008) e Amorim (2014), as respostas comportamentais são marcadores importantes de estudo, por poderem ser evidenciadas em concentrações ecologicamente relevantes (subletais). Isso pode ser perceptível em contaminações com metais pesados presentes na água, onde estes causam a diminuição ou aumento de comportamentos

predatórios (MONTIGLIO e ROYAUTE, 2014). Em se tratando dos peixes, é notória a importância de alterações sobre o comportamento padrão dos organismos, visto que, são as características específicas (biológicas, químicas e físicas) que conduzem sua adaptação às exposições ecológicas, e direcionam sua sobrevivência no hábitat (AMORIM, 2014).

É de suma importância o comportamento animal como objeto de estudo para o entendimento de mecanismos subjacentes às respostas bioquímicas e fisiológicas que instigam o organismo a realizar nuances e/ou repertório comportamental, pois são fundamentais para sobrevivência animal frente à perturbações ambientais (GOUVEIA JR *et al.*, 2006). De acordo com Amorim (2014), existem várias formas de se estudar o comportamento animal frente à toxicantes, e um deles é por intermédio de observações e quantificações (*scores*) de inúmeros parâmetros (*endpoints*) a que se almeja avaliar, onde podem ser incluídas respostas como, medo/fuga, agressividade, memória, capacidades de locomoção, reprodução, alimentação, entre outras nuances.

Frente à exposição ambiental por diferentes moléculas orgânicas ou inorgânicas, Scott e Sloman (2004), relatam que as respostas intrínsecas que provocam alterações morfológicas à situações alheias são estimuladas por ações e/ou reações paralelas que podem ser interpretadas conjuntamente como o comportamento; onde os estímulos podem ser fatores internos, do próprio organismo (bioquímicos, biológicos e/ou fisiológicos) ou mesmo externos (físicos e/ou ecológicos). Em ambientes sujeitos à ações antrópicas como à dispersão de produtos químicos, existe risco eminente de “pressão seletiva” sobre espécies como possíveis efeitos adversos desses agentes (FLEEGER, CARMAN e NISBET, 2003).

Existem relatos de que, na antiguidade, Aristóteles realizou experimentos expondo peixes de água doce em água marinha, para estudar as respostas desses organismos (BUIKEMA e VOSHELL, 1993). No Brasil, estudos de investigações comportamentais em peixes estão presentes nas literaturas, sendo reportados em testes com contaminantes isolados ou efluentes múltiplos em testes ecotoxicológicos dos mais diversos fins (GOUVEIA JR *et al.*, 2006). Estudos na literatura demonstram efeitos de alterações comportamentais relevantes na toxicidade de agentes químicos sobre os peixes. Segundo Levin *et al.*, (2004), os efeitos sobre a natação dos peixes são sempre investigados, porque alterações nas respostas de atividade motoras podem indicar a situação tóxica a que o organismo está submetido.

Radhaiah, Giriya e Rao (1987), mencionam que, dentre os principais efeitos subletais associados à exposições a estressores químicos descritos na literatura estão: inquietação,

movimento rápido, dificuldades respiratórias, secreção excessiva de muco, convulsão, letargia, perda de equilíbrio e mudança na coloração. Deb e Das (2013), incluem mudanças em preferência de temperatura e esquia comportamental como alterações subagudas. De acordo com Jarvinen e Tanner (1982), o comportamento dos organismos vivos das biotas em ambientes aquáticos são sujeitos a sofrer influências de perturbações químicas, que conseqüentemente desequilibram o sistema fisiológico destes indivíduos.

Para Venturini (2010), Amorim (2014), e Wolff e Donatti (2016), quando submetidos à condições desfavoráveis, os peixes passam a apresentar respostas fisiológicas compensatórias pelo mecanismo de estresse, na tentativa de sobreviver. Isto pode comprometer o equilíbrio homeostático do indivíduo, que pode se restabelecer sofrendo adaptação fisiológica e comportamental (CHROUSOS, 1998), ou quando tais respostas excedem os limites de tolerância geralmente ocorre morte (ROTTMANN, FRANCIS-FLOYD e DURBOROW, 1992).

Com base nas evidências neurotóxicas, da literatura, para os organofosforados sobre os peixes, é possível observar que a convulsão é um dos sinais sistêmicos principais associados aos efeitos graves destes agentes químicos. Assim, vale sobressaltar, que a convulsão é um dos efeitos globais causados pela hiperestimulação colinérgica, gerados pela intoxicação aguda à nível de sistema nervoso central e periférico, que ocasionam crise ou síndrome colinérgica, segundo Linhares (2014). No entanto, nos peixes, os relatos de convulsão frente ao clorpirifós ou outros organofosforados são apenas citados como sinais de alterações observados, e não existem maiores detalhes.

Contudo, Bem Hur Mussulini *et al.*, (2013) apontam para a importância em se caracterizar os efeitos de alterações comportamentais vistas em modelos experimentais (assim como os peixes), para a elucidação complementar sobre os efeitos de fármacos ou tóxicos com mecanismos de ação reconhecidos. Para tanto, estes autores, utilizaram o fármaco padrão pentilenotetrazol (PTZ), que comumente é usado para estudo de epilepsia em modelos animais, mas, apesar de sua constante utilização, tais autores citam a falta de características indicativas de crises epilépticas com informações mais detalhadas. De tal modo, que caracterizaram as eventuais alterações comportamentais da epilepsia, e elencaram alguns estágios (parâmetros): nado curto (0); aumento da atividade de natação e frequência de movimentos operculares (1); movimentos erráticos (2); movimentos circulares (3); comportamento semelhante a convulsão clônica (4); afundamento e comportamento semelhante a convulsão tônica (5); morte (6).

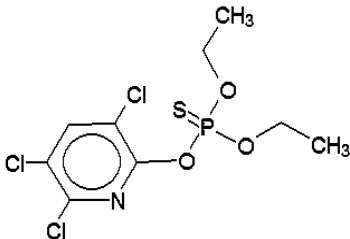


Segundo relatos destes mesmos autores, a epilepsia, é um transtorno que atinge o sistema nervoso central (SNC) e provoca diferentes tipos de crises convulsivas recorrentes, onde suas manifestações ocorrem a partir de distúrbios e/ou desordens neuronais complexas. Pelos inúmeros casos incidentes no Brasil (onde ocorreu a pesquisa) e no mundo, a epilepsia possui grande importância para a saúde pública. Nessa tomada, pode-se relacionar a importância em se estudar respostas semelhantes em peixes nos estudos com organofosforados, pois esta classe de agentes químicos possui ações neurotóxicas que provocam efeitos sobre o sistema nervoso, e que podem levar à convulsão e morte aos indivíduos intoxicados.

## 2.9 O USO DO PESTICIDA CLORPIRIFÓS E SUA TOXICIDADE SOBRE O COMPORTAMENTO DE PEIXES COMO ORGANISMOS NÃO ALVO

O clorpirifós é considerado altamente tóxico (classe toxicológica I) para a saúde animal e humana, e seu potencial de risco ambiental é muito perigoso (classe II) (BRASIL, 2016). Pelas suas características físico-químicas, este composto apresenta baixa solubilidade, alta lipofilicidade e baixa volatilidade em ambiente ácido, logo, torna-se menos persistente em ambiente alcalino (Tabela 1).

**Tabela 1** - Informações sobre as propriedades físico-químicas do pesticida clorpirifós

Propriedades	Características
Nome Químico	0,0-dietil O-(3,5,6-tricloro-2-piridila) fosforotioato
Nome Comum	Clorpirifós
Nº de registro CAS	002921-88-2
Peso Molecular	350,59
Formula Molecular	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> PS
Estrutura Química	
Estado Físico	Emulsão Cremosa
Ponto de Fusão (°C)	42 °C
Pressão de Vapor a 25 °C	2,51 x 10 <sup>-5</sup> mmHg
Constante da Lei de Henry a 20 °C	0,00000293 atm·m <sup>3</sup> /mol
Solubilidade em água a 24 °C	1,12 mg/L
Log de P (n-octanol/água)	4,96
Estabilidade a 25°C	pH 4,7-63 dias pH 6,9-35 dias pH 8,1-23 dias

**Fonte:** <https://www.srcinc.com>; Mori (2006).

No ano de 2004, a ANVISA proibiu a disponibilidade de produtos domissanitários à base de clorpirifós. Não obstante, o MAPA mantém sob recomendações seu uso, em atividades agrícolas, como plantações de soja, algodão, batata, milho, entre outras. Este é um composto organofosforado bastante empregado como alternativa de combate às pragas, nas agriculturas por todo o território nacional (BRASIL, 2016).

Evidências literárias informam sobre a toxicidade extrema que o pesticida organofosforado clorpirifós representa para organismos não alvo aquáticos, e apontam para os peixes como ferramentas importantes de estudos com este composto. A toxicidade deste inseticida expõe os indivíduos à riscos como: alterações morfológicas, comportamentais, oxidativas, bioquímicas, histopatológicas, hematológicas, além de alterações no desenvolvimento, entre outros (SUNANDA *et al.*, 2016).

Em diferentes estudos, este xenobiótico provocou interrupção do sistema endócrino em peixes expostos à concentrações relevantes ecologicamente (subagudas), muito abaixo da faixa de letalidade, além de disfunção comportamental, pois comprometeu o comportamento da espécie durante seu desenvolvimento (LEVIN *et al.*, 2004; ORUÇ, 2010; MAJUMDER e KAVIRAJ, 2018). Segundo o estudo de Yaseen *et al.*, (2019), os organofosforados malation e o clorpirifós, causaram efeitos histopatológicos nos tecidos de rins e fígados de ratos expostos.

Naime (2017), relata que talvez este seja o pesticida mais investigado, quanto à neurotoxicidade no desenvolvimento, visto que, conferiu efeitos citotóxicos sobre células HT22 do hipocampo de ratos. Outrossim, Meyer (2005), através de testes em cobaias (ratas e ratos) no período gestacional e pós-natal, inferiram que o desenvolvimento do sistema nervoso central pode ser afetado com a exposição prolongada ao clorpirifós, e correlacionam tais efeitos à exposição humana. Ademais, Eaton *et al.*, (2008), destacaram que este composto é muito tóxico para a saúde, pois, evidenciaram sua neurotoxicidade sob exposição prolongada em ensaios *in vitro* durante o desenvolvimento neural.

A neurotoxicidade do clorpirifós foi evidenciada no desenvolvimento cerebral de ratos durante o trabalho de Hazarika *et al.*, (2013). Em estudo mais recente, Cunha *et al.*, (2018) investigou a toxicidade aguda do clorpirifós *in vitro* e *in vivo* revelando efeitos toxicológicos cardíacos e respiratórios de ação pós-exposição prolongada. Os autores Joshi, Mathur e Gulati (2007), e Haviland, Butz e Porter (2010), verificaram efeitos de disfunção endócrina na fase embrionária de camundongos, que provocou distúrbios na tireoide, além de esterilidade em machos. Corroborando com estes, Ventura *et al.*, (2016), encontraram evidências de que, este

pesticida é potencialmente tóxico, pois, causou disfunção endócrina em ratos expostos por 100 dias, atuando como fator de risco carcinógeno.

Muitos trabalhos reportam a toxicidade do clorpirifós para organismos de táxon diferente, sobretudo de efeitos histopatológicos em tecidos-alvo (EATON *et al.*, 2008; CUNHA, 2014; MELO, 2015; NEGRO e COLLINS, 2017; CUNHA *et al.*, 2018; YASSEN *et al.*, 2019). Na pesquisa de Bednarska *et al.*, (2016), o clorpirifós foi estudado em oligoquetas (minhocas) demonstrando alta toxicidade na inibição anticolinesterásica. Em crustáceos (caranguejos), foram reportados efeitos histopatológicos de exposição crônica como, necrose, edema e hemorragia encontrados em células das brânquias, além de atrofia muscular e deformações em tecidos reprodutores (MAHARAJAN, NARAYANASAMY e GANAPIRIYA, 2015). Além destes, foram revelados efeitos persistentes histopatológicos de hiperplasia em brânquias, aumento de células de desintoxicação no hepatopâncreas e de oócitos, após exposição subaguda ao clorpirifós (NEGRO e COLLINS, 2017).

Kunjamma *et al.*, (2008), estudaram a toxicidade do clorpirifós (95% i. a.) para a tilápia (*Oreochromis mossambicus*) em exposição a concentrações crônica, e apreciaram efeitos histopatológicos, em tecidos de brânquias e fígado. Assim também, Kathun *et al.*, (2016), reportaram danos de degeneração gradual como efeito dose-dependente, vistas em tecidos de rins, fígado e brânquias em *Heteropneustes fossilis* (Bloch) em exposição crônica de 30 dias. Contribuindo com estes pesquisadores, Raibeemol, Chitra e Raibi (2016) também encontraram efeitos de destruição das lamelas nos tecidos branquiais da espécie *Pseudotroplus maculatus* (Bloch), em curta exposição de 96 horas na concentração subletal de 0.661µg/L do clorpirifós (97% i. a.), sendo as alterações percebidas a partir de 48 horas.

Ali *et al.*, (2009) expuseram o “peixe gato” (*Channa punctatus*) (Bloch) nas concentrações de 68, 102 e 203µg/L do clorpirifós (20% EC), e encontraram danos no DNA, com forte presença de MN em células amostrais de sangue e brânquias, através dos testes de micronúcleo e cometa, na maior concentração (203µg/L). No estudo desenvolvido por Li *et al.*, (2013) verificaram-se efeitos de imunotoxicidade na carpa comum (*Cyprinus carpio*), sobre as atividades da lisozima, do conteúdo de complemento C3 e IgM, e expressões IgM e complemento C3 como dano imunológico. Bhatnagar, Yadav e Cheema (2016), também estudaram atividades genotóxicas do clorpirifós (50% EC) em alevinos de *Cirrhinus mrigala* sob concentrações subagudas (0.02, 0.04 e 0.08mg/L) durante 35 dias, e no teste do micronúcleo constataram maior indução de MN em eritrócitos no 14º dia na maior concentração.

No trabalho realizado por Rendón-von *et al.*, (2005), a concentração de 0.05mg/L do clorpirifós (480 EM) provocou efeitos deletérios em “peixe mosquito” (*Gambusia yucatana*), com 50% de inibição de atividades da acetilcolinesterase nos músculos reduzindo em 80% a agilidade muscular, e de 30% no cérebro reduzindo em 50% a agilidade cerebral. Do mesmo modo que, Sharbidre, Metkari e Patode (2011) detectaram efeitos deletérios em brânquias, fígado e cérebros de *Poecilia reticulata*, com inibição da acetilcolinesterase em cérebros, que mostrou-se dose-dependente, onde as maiores concentrações inibiram até 45% as atividades, além de indução de estresse por oxidação. Wang *et al.*, (2011) encontraram efeitos do clorpirifós sobre a reprodução e sistemas nervoso e imunológico de peixes.

Na pesquisa de Oruç (2010), expondo a “Tilápia do Nilo” (*Oreochromis niloticus*), nas concentrações subletais de 5, 10 e 15µg/L do clorpirifós (480 EC), observou-se desregulações endócrinas, redução persistente nos níveis de AChE, e hormônios reprodutivos (estradiol sérico e testosterona), e aumento nos níveis de cortisol sugerindo estresse oxidativo. Caio Rodrigo de Assis *et al.*, (2010), investigaram a enzima acetilcolinesterase (AChE) em cérebro de tambaqui, e avaliaram o potencial de sua atividade sob inibição *in vitro*, como marcadores biológicos para pesticidas organofosforados (diclorvós, diazinon, clorpirifós, pirofosfato de tetraetil), mais dois carbamatos (carbaril e carbofurano), e encontraram aproximadamente 70% de ação anticolinesterásica.

No recente estudo de Majumder e Kaviraj (2018), o clorpirifós de formulação comercial (20% EC) e técnica (94% de i. a.) foram avaliados em “tilápia do Nilo”. Verificando-se em exposição aguda: alterações bioquímicas de redução nos níveis de glicogênio hepático, de fosfatase alcalina, acetilcolinesterase, e catalase no fígado, e também de, aumento nos níveis de glicose plasmática, atividades de fosfatase ácida hepática, aspartato e alanina aminotransferase. Já nas doses subletais de 12 e 25µg/L, sob exposição de 28 dias, percebeu-se anemia, e em exposição mais prolongada de 90 dias, diminuição de índice protéico e lipídico corporal.

Entretanto, vários pesquisadores já evidenciaram respostas de alterações comportamentais provocadas pela exposição à este agente químico em testes de toxicidade em peixes (ADEYEMO, AKINTOYE e OGHI, 2004; WOKE e ALELEYE-WOKOMA, 2009; RAMESH e DAVID, 2009; NWANI *et al.*, 2013; PARACAMPO *et al.*, 2014). Peixes expostos à este estressor apresentaram anormalidades no comportamento como: natação errática, movimento opercular acelerado e letargia (TILAK, VEERAIHAH e RAO, 2004; SLOTKIN, OLIVER e SEIDLER, 2005). Mediante investigações crônicas, sobre a influência de toxicidade

do clorpirifós para o ciclo de vida dos peixes, foi observada maior suscetibilidade na fase de crescimento embrionária do *Danio rerio* (JARVINEN e TANNER, 1982).

O clorpirifós pode causar alterações de comportamentos persistentes até a fase adulta em larvas e embriões de *Danio rerio* (LEVIN *et al.*, 2004). Varó *et al.*, (2000) e Levin *et al.*, (2004), observaram nado errático no ciclo de vida, desde a fase inicial perdurando até a idade adulta nesta espécie, após exposição crônica ao clorpirifós. Outrossim, Venkateswara *et al.*, (2005) e Kwong (2002), verificaram deformações morfológicas de locomoção em sua fase larval, sob exposição subaguda por 7 dias consecutivos, e em fase embrionária o comprometimento da habilidade de se alimentar.

Nas investigações sobre a influência de toxicidade deste pesticida para o ciclo de vida em exposição crônica de peixes, foi observada maior suscetibilidade em fase de crescimento (JARVINEN e TANNER, 1982; RICHMONDS e DUTTA, 1992).

## 2.10 CHARACIDAE – *COLOSSOMA MACROPOMUM* (CUVIER, 1818) COMO ORGANISMO MODELO PARA AVALIAÇÃO DE CONTAMINANTES

A espécie de peixe estudada, *Colossoma macropomum*, pertence à ordem Characiforme e família Serrasalmidae, reconhecido popularmente como tambaqui, peixe redondo, ruelo, ou bocó, vem a ser o maior caracídeo conhecido da fauna amazônica. Quando adulto chega a alcançar o tamanho de até 1 metro, sendo considerado o segundo maior peixe de escama da Amazônia (SANTOS, 2010). Com ocorrência nativa de rios das bacias Amazonas e Orinoco, este possui ampla distribuição na Amazônia e participa do equilíbrio ecológico de vários ecossistemas amazônicos (ARAÚJO-LIMA e GOULDING, 1998; MENDONÇA *et al.*, 2009).

Normalmente pratica migração para reprodução em período de cheia, e deposita seus ovos na vegetação submersa de ambientes de várzeas e/ou áreas inundadas (MENDONÇA *et al.*, 2009). Possui hábitos alimentares naturais diurnos, predominando a ingestão de zooplanktons em circunstâncias de seca, quando há maior escassez de alimentos, enquanto em períodos de cheia, comumente ocorre a ingestão de frutos e sementes (GOULDING e CAVALHO, 1998; SILVA, PEREIRA-FILHO e OLIVEIRA-PEREIRA, 2000; TUNDISI, 2008). Geralmente, esses alimentos fazem parte da dieta principal, e podem ser ingeridos simultaneamente com alguns tipos de insetos, moluscos, algas, macrófitas, peixes, e por

possuírem dieta bastante abrangente são chamados de onívoros “oportunistas” (RODRIGUES, 2014).

Este peixe possui características biológicas adaptadas para sua sobrevivência nas regiões da Amazônia, de águas brancas ou pretas, pois comumente sobrevive em temperaturas quentes, além do que, não costuma encontrar dificuldades em se adaptar a condições adversas de sazonalidade, e toleram variação no pH e outros parâmetros aquáticos (ARAÚJO-LIMA e GOULDING, 1998; SANTOS, 2010). Devido a sua fácil adaptação ecológica, foi introduzido em diferentes países na década de 1980, incluindo Costa Rica, China, Cuba, Estados Unidos, Filipinas, Guatemala, Taiwan, dentre outros (MENDONÇA *et al.*, 2009; SANTOS, 2010).

De acordo com Kubtiza (2004), esta é uma das principais espécies cultivadas no Brasil, e segundo Brabo *et al.*, (2014), Lima *et al.*, (2016) e Zacardi *et al.*, (2017), o estado do Pará (PA) tem se destacado como um dos maiores produtores comerciais no campo da piscicultura do tambaqui, advindo principalmente pelo cultivo, e em menor escala pela pesca artesanal, sendo portanto muito importante para a economia de municípios locais.

Conforme as evidências literárias, esta espécie é usada em diferentes pesquisas toxicológicas, como biomarcador para estudos de toxicidade com pesticidas, organofosforados, carbamatos, e outros (MENEZES, 2005; ASSIS, 2008, CASANOVA, 2008; CHAPADENSE *et al.*, 2009; MOURA, 2009; ROCHA, 2009; ASSIS *et al.*, 2010; GROFF *et al.*, 2010; ARANHA, 2013; KOCHANN *et al.*, 2013; CUNHA, 2014; SOUZA, 2014).

### **3 JUSTIFICATIVA**

O clorpirifós é uma molécula extremamente perigosa e amplamente usada na atividade de defesa agrícola em lavouras temporárias e permanentes na Amazônia. Esta molécula, é o ingrediente ativo de pesticidas de formulações comerciais (inclusive o Klorpan<sup>®</sup>), que comumente são aplicados em monoculturas temporárias, principalmente de grãos de soja, situadas às margens da Rodovia BR-163, em seus trechos, entre os municípios, Belterra-PA, Mojuí dos Campos-PA e Santarém-PA.

Diante disso, são necessários estudos sistemáticos que visibilizem fatores como o comportamento e transformação desta molécula nos ambientes aquáticos dessas áreas, e sobretudo, apontem para os efeitos e riscos tóxicos ainda não conhecidos e caracterizados para a saúde ambiental. O clorpirifós é volátil em altas temperaturas, com meia-vida aumentada em

pH ácido (EATON *et al.*, 2008), o que aumenta a relevância quanto a preocupação com os efeitos que esta molécula pode oferecer aos ecossistemas amazônicos.

Além disso, para Souza (2014), de um modo geral, as propriedades tóxicas de agentes químicos podem apresentar capacidades de interação desconhecidas, ampliando seus riscos na natureza. Poucos estudos ecotoxicológicos ainda são conduzidos, (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008), considerando a diversidade biológica da Amazônia (SABINO, 2000).

Assim, este estudo busca somar conhecimentos sobre um dos principais problemas ambientais correlacionados com o avanço da agricultura na região, como o uso intensivo de pesticidas. Contribuindo para a avaliação de riscos ambientais e ecológicos, ainda pouco conhecidos, que estes toxicantes podem provocar sobre os diferentes mosaicos sistêmicos particulares que abrigam uma riqueza de organismos endêmicos, isto é mandatório e prioritário para a ciência.

Neste contexto, o juvenil da espécie *Colossoma macropomum*, foi eleito o modelo para a realização deste estudo ecotoxicológico, por apresentar alta representatividade ecológica (SOUZA, 2014), maior facilidade de manuseio em laboratório, além de apresentar sensibilidade por exposição à diversos tóxicos (ROCHA, 2009).

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 GERAL

Avaliar a toxicidade aguda do pesticida Klorpan<sup>®</sup> empregado em lavouras temporárias na Região Amazônica utilizando o *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818) como organismo teste.

### 4.2 ESPECÍFICOS

- Estabelecer a concentração média letal (CL<sub>50-96h</sub>) do pesticida Klorpan<sup>®</sup> de formulação comercial (480 EC) sobre indivíduos juvenis de tambaqui;
- Caracterizar os efeitos comportamentais do pesticida Klorpan<sup>®</sup> sobre indivíduos juvenis de tambaqui.

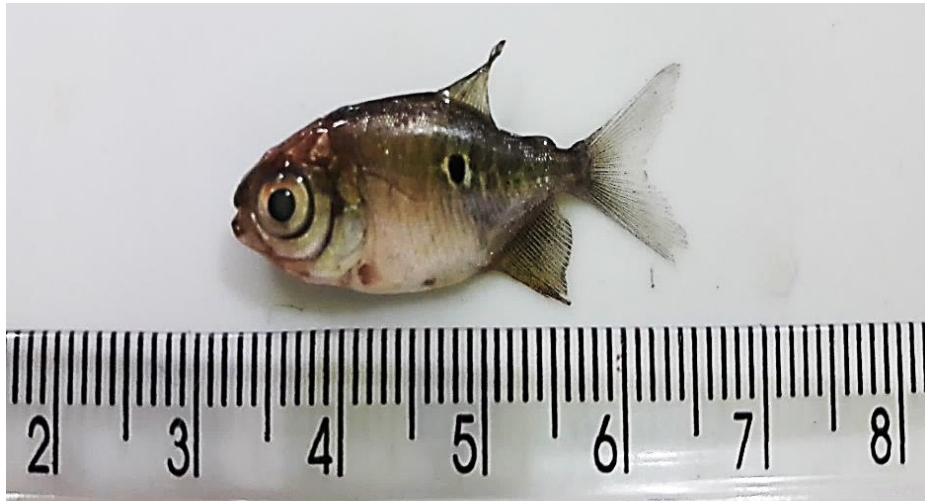


## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 ANIMAIS

Foram usados 400 juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*), com peso médio de  $1.02 \pm 0,06\text{g}$ , e comprimento padrão de  $2.8 \pm 0,16\text{cm}$ , adquiridos de uma piscicultura comercial, abastecida pela Estação de Piscicultura Santa Rosa, Santarém-Pará, Brasil. Na UFOPA (Unidade Tapajós), os espécimes foram acondicionados em caixas d'água de 250L, sob densidade de pelo menos 1g de massa corporal por litro, em ambiente aberto e sombreado, sob fotoperíodo natural claro/escuro de 12/12 horas, durante 20 dias antecedentes aos testes.

**Figura 5** - Exemplar juvenil de *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818)



**Fonte:** Arquivo autoral, 2017

### 5.2 ACLIMATAÇÃO

As caixas foram previamente lavadas com detergente neutro Extran<sup>®</sup> (MA 02), e equipadas com filtro mecânico/biológico de espuma artesanal, suspensos, e acoplados a bombas submersas de recirculação, da marca ‘Sarlobetter<sup>®</sup>’ (modelo SB1000A), e compressores de aeração da marca ‘Sobo Aquarium Air Pump CE<sup>®</sup>’ (modelo SB 648A), com saídas de ar conectadas a pedras porosas para garantir oxigenação constante no meio.

A priori, para amenizar o estresse osmótico dos juvenis, e fazer profilaxia antiparasitária, logo após a chegada, os peixes foram expostos durante 14h a banho de sal

comum não iodado (2g/L), pesado e adicionado diretamente no meio, segundo o método de Tavares-Dias (2015).

A água usada na manutenção diária foi de origem subterrânea (poço artesiano), e teve seu pH de 4.2 a 4.5 corrigido com sal de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) entre 6.8-7.5, considerando-se níveis toleráveis para a espécie e adequados para os bioensaios. A temperatura da água apresentou variáveis entre 26 a 30 °C, e os níveis de oxigênio dissolvido  $\geq 6\text{mg.L}^{-1}$ .

Diariamente, os animais foram alimentados no período de manhã e à tarde com ração comercial balanceada (32% de proteína bruta), até aparente saciedade (LIMA, 2013). Por conseguinte, eram feitas sifonagens diárias para retirada de dejetos e restos alimentares, seguidas de renovação parcial do volume de água para evitar o acúmulo de amônia e contribuir para o bem-estar dos animais. E após aclimatados, os indivíduos saudáveis foram usados nos ensaios de toxicidade aguda.

### 5.3 CONDIÇÕES DE APLICAÇÕES DOS ENSAIOS DE TOXICIDADE NO LABORATÓRIO

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. As etapas experimentais foram conduzidas no Laboratório de Química Aplicada a Toxicologia, Saneamento Ambiental e Recursos Hídricos da UFOPA (Unidade Tapajós). Sendo adotadas e adaptadas as orientações do Guia N° 203 para Testes de Toxicidade Aguda em Peixes da OCDE (1992) e da norma da ABNT 15088:04 (2004). Este estudo está inserido no projeto “Determinação para peixes amazônicos da ecotoxicidade e risco de pesticidas utilizados em lavouras de soja”, sob aprovação de nº 06004/2016.pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFOPA.

**Testes de Toxicidade Aguda:** A sensibilidade dos lotes de juvenis foi testada previamente com a substância de referência dicromato de potássio, para posterior aplicação do testes de toxicidade aguda com o pesticida clorpirifós. Em ambos os casos foram estimadas as concentrações médias letais para 50% dos indivíduos amostrais. Para tanto, foi utilizado um circuito com dezesseis (16) aquários de vidro transparente, de capacidade para 17L, sendo usado 16L do total na realização dos testes. Os recipientes foram mantidos sob aeração contínua através de aeradores da marca ‘Sobo Aquarium Air Pump’ (modelo SB 648A), com saídas de ar conectadas a pedras porosas. Durante os testes, os aquários ficaram cobertos com suas tampas, e recobertos com plástico filme, a fim de minimizar a volatilização do meio, mas, a

abertura dos aeradores foram, cuidadosamente, contornadas para não interferir na aeração. Todos os experimentos ocorreram em 96h sob sistema estático, sem renovação de água e sifonagem. E os animais tiveram alimentação suspensa 24 horas antes do início dos testes.

**Análises Físico-Química da Água:** Foram monitorados alguns dos parâmetros [pH, oxigênio dissolvido, temperatura, condutividade elétrica, dureza total, amônia total, e alcalinidade] em cada unidade no decorrer do teste, nos intervalos de: 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 e 96 horas de teste. Utilizando-se: um equipamento multiparamétrico da 'AKSO' (modelo AK88), um multisensor da marca 'HANNA' (modelo HI9828), e um espectrofotômetro da marca 'HANNA' (modelo HI83203).

**Parâmetros avaliados:** Os peixes tiveram mortalidade inspecionada nos respectivos intervalos de: 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 e 96h de teste. Além disso, efeitos indicando alterações no comportamento dos juvenis expostos aos toxicantes foram anotados pelo observador e feitos registros testemunhos com vídeos de 2 minutos. São estes: aumento ou diminuição da respiração opercular, perda de equilíbrio, excitabilidade, aumento ou diminuição de excretas, mudança de coloração, liberação de muco, convulsão, espasmos, letargia, natação errática, entre outros. As análises posteriores dos dados geraram tabelas descritivas dos comportamentos normais (sem efeitos tóxicos) e comportamentos alterados por efeitos do tóxico no período de teste.

No decorrer dos testes, os indivíduos aparentemente mortos, foram retirados do aquário com puçá, e tocados com bastão de vidro na região distal da cauda e opercular, não esboçando respostas mecânicas aos estímulos, foram feitas coletas dos dados biométricos (pesados em balança analítica, e medidos comprimentos padrão e total). O quantitativo de indivíduos mortos nas diferentes concentrações foi utilizado para estimar a  $CL_{50-96h}$ . Os animais expostos às concentrações que não morreram no tempo estimado, incluindo o branco (controle), foram sedados por exposição de 10 minutos ao fármaco Acepran<sup>®</sup> (1g/100mL), diluído na razão de 1:2 (m/v). Logo em seguida pesados, medidos, e feito a secção medular na região ventro-dorsal, e suas carcaças foram descartadas adequadamente.

Foi elaborado um etograma prévio para a espécie estudada, com rápidas descrições de comportamentos basais observados nos juvenis de tambaqui, expostos em aquários ausentes de tóxico (ambiente controlado). Para que, posteriormente, os sinais comportamentais de intoxicação observados nos animais expostos pudessem ser comparados às características dos comportamentos normais sem o tóxico. Nas análises dos vídeos e estimativas quantificadas dos

dados, um observador “cego” (*i.e.* participante alheio ao trabalho, devidamente treinado no período dos testes preliminares), contribuiu para o levantamento dos dados quantitativos acerca das alterações observadas, usando tabelas pré-elaboradas com parâmetros observados nos ensaios preliminares.

#### 5.4 APLICAÇÃO DO TESTE DE TOXICIDADE AGUDA UTILIZANDO A SUBSTÂNCIA REFERÊNCIA DICROMATO DE POTÁSSIO PARA AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE TÓXICA DA ESPÉCIE

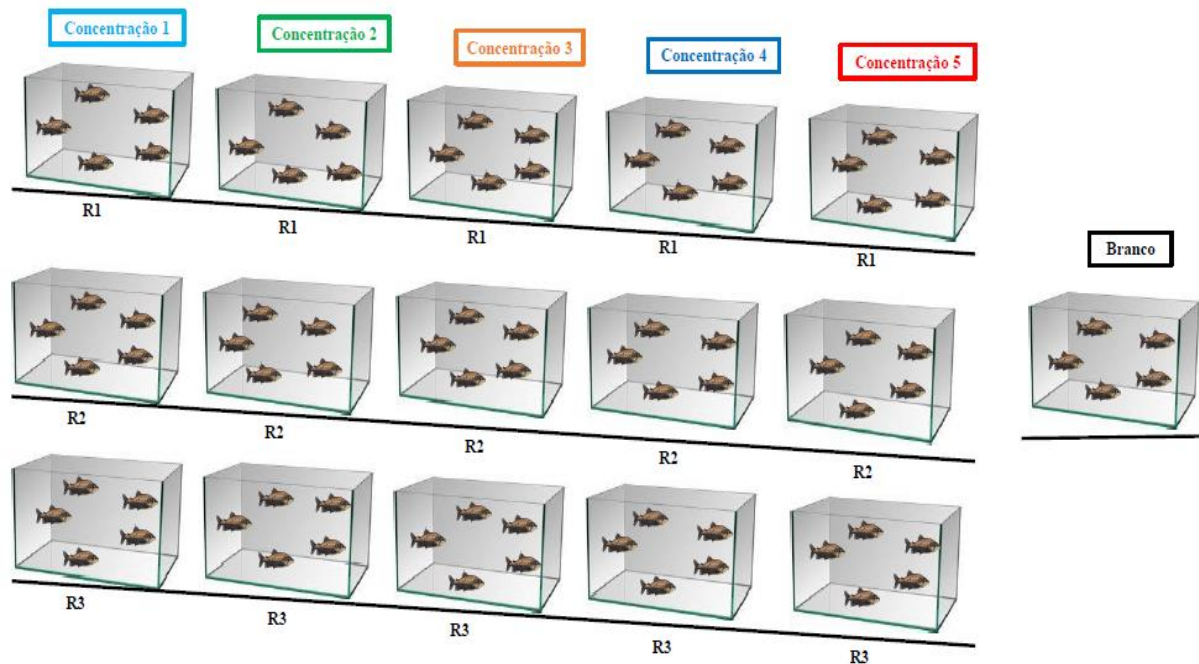
**Tóxico:** Dicromato de Potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ), é um composto sólido cristalizado, classificado quimicamente como sal inorgânico oxidante, possui tom de coloração laranja avermelhado. É utilizado pela indústria química para produção de corantes e como biocida (SOUZA *et al.*, 2014). Este composto é recomendado pela USEPA (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos) para testar a sensibilidade de organismos aquáticos em ensaios laboratoriais, para o controle de letalidade como substância referência de positividade para estudar outros xenobióticos com a espécie (LOUREIRO *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2014). De acordo com Zagatto e Bertolotti (2008), é indispensável que haja o conhecimento e/ou avaliação prévia da sensibilidade tóxica dos organismos-testes como referência positiva de mortalidade. Segundo estes, serve para conferir melhor confiabilidade e consistência aos resultados obtidos dos ensaios de toxicidade sobre outros agentes químicos.

**Preparo da solução:** O volume de  $K_2Cr_2O_7$  foi pesado em balança analítica para cada replicata (de acordo com a concentração), e em seguida diluído em béquer para 1L de água (isenta de tóxico), na razão de 1:1 (m/v). Esta solução foi imediatamente adicionada no aquário completando 16L. Na sequência de aplicação em cada replicata, foi estabelecido intervalo de 8 minutos, para padronização do tempo de registros observacionais entre as unidades.

**Teste de Toxicidade Aguda:** Foram feitos três ensaios preliminares, com uma replicata (n=5) para cada concentração mais o branco, sendo estimada a faixa de letalidade entre 50 a 215 mg/L da substância de referência dicromato de potássio, utilizando-se 90 indivíduos nesta etapa. No teste definitivo, os indivíduos foram distribuídos em triplicatas (n=15) por concentração e um branco sem o tóxico, perfazendo 80 indivíduos (Figura 6). A concentração média letal (50%) em 96 horas foi estabelecida no intervalo entre a menor concentração letal e a maior concentração não letal. Os grupos receberam as seguintes concentrações nominais do dicromato de potássio (DP): Branco (B): 0mg/L; Grupo Dicromato de Potássio I (GDP-I):

50mg/L; Grupo Dicromato de Potássio II (GDP-II): 100mg/L; Grupo Dicromato de Potássio III (GDP-III): 125mg/L; Grupo Dicromato de Potássio IV (GDP-IV): 150mg/L; Grupo Dicromato de Potássio V (GDP-V): 215mg/L.

**Figura 6** - Esquema ilustrativo da aplicação do teste de toxicidade aguda (96h) em aquário.



Fonte: Autoral, 2017

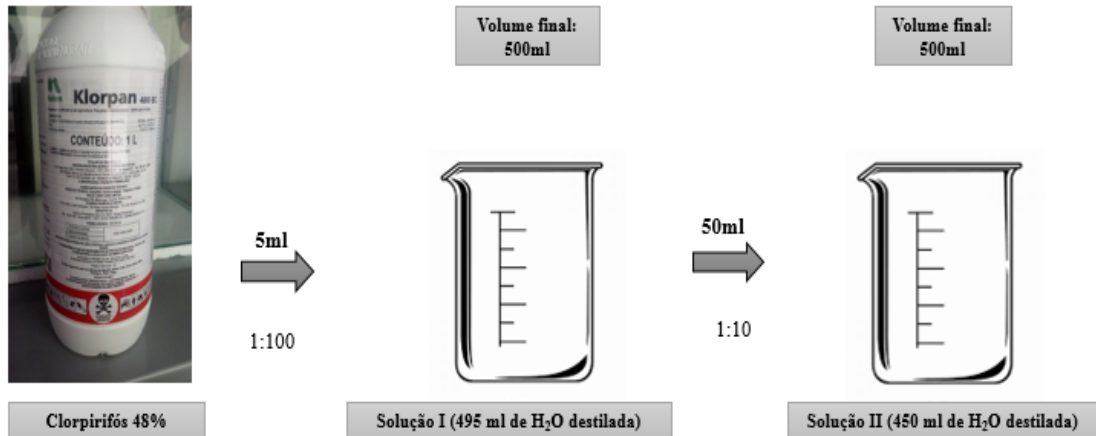
## 5.5 APLICAÇÃO DO TESTE DE TOXICIDADE AGUDA UTILIZANDO PESTICIDA CLORPIRIFÓS PARA AVALIAÇÃO DE SEU POTENCIAL TÓXICO PARA A ESPÉCIE

**Tóxico:** Klorpan<sup>®</sup> (480 EC), produzido pela Nufarm Ltda., registrado sob o N<sup>o</sup> 07899 no MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento). Normalmente indicado e vendido por profissionais de casas agropecuárias da região para o combate de variedades de pragas em culturas de algodão, batata, café, cevada, citros, feijão, maçã, tomate, milho, pastagens, soja, sorgo, e trigo.

**Preparo da solução:** Foram feitas duas diluições do Klorpan<sup>®</sup> 480 EC (480 g/L) com 48% de ingrediente ativo (Figura 7). Primeiramente, foi diluído 5mL do produto para 500mL de água destilada em béquer, na razão de diluição 1:100 (m/v). Subsequentemente, foi retirado 50mL desta solução e diluído em outro béquer para 500mL de água destilada, na razão de 1:10 (m/v). As concentrações nominais foram imediatamente pipetadas desta última solução nas replicatas com 16L. Na sequência de aplicação das concentrações em cada replicata, foi

estabelecido intervalo de 8 minutos, para padronização do tempo de registros observacionais entre as unidades.

**Figura 7** - Esquema ilustrativo da diluição do pesticida clorpirifós para ser aplicado no teste de toxicidade aguda (96h)



Fonte: Autoral, 2017

**Teste de Toxicidade Aguda:** Foram feitos cinco ensaios preliminares com uma replicata (n=5) para cada concentração mais o branco, sendo estimada a faixa de letalidade entre 2.5 e 45µg/L do clorpirifós, utilizando-se 150 indivíduos nesta etapa. No teste definitivo, os indivíduos foram distribuídos em triplicatas (n=15) por concentração e um branco sem o tóxico, perfazendo 80 indivíduos. A concentração média letal (50%) em 96 horas foi estabelecida no intervalo entre a menor contração letal e a maior concentração não letal.

Os grupos receberam as seguintes concentrações nominais do clorpirifós (CPF): Branco (B): 0µg/L; Grupo Clorpirifós I (GCP-I): 2.5µg/L; Grupo Clorpirifós II (GCP-II): 10µg/L; Grupo Clorpirifós III (GCP-III): 15µg/L; Grupo Clorpirifós IV (GCP-IV): 25µg/L; Grupo Clorpirifós V (GCP-V): 45µg/L.

## 5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a determinação da CL<sub>50-96h</sub>, foram realizados tratamentos de probabilidade no programa Trimmed Spearman-Kärber, versão 4.1, proposta por Hamilton, Russo e Thurston (1977), por intermédio da regressão não linear logarítmica do efeito de letalidade usando o método de Probit, com as concentrações nominais usadas.

Os aspectos de análises comportamentais do animal modelo decorreram no modo de pesquisa descritiva/exploratória, incluindo abordagem qualitativa e quantitativa. O método descritivo viabiliza descrever as características de uma determinada população ou amostra permitindo a coleta de dados através do uso de recursos e técnicas padronizadas, bem como instrumentos pré-elaborados (tabelas, questionários, entre outros), tomando forma de levantamento no geral, enquanto que a metodologia exploratória busca explicitar ou gerar hipóteses, a partir de pesquisas literárias, e ainda estudos de caso (GIL, 2009).

Em relação aos procedimentos técnicos, foram desenvolvidos levantamentos literários de publicações anteriores (GIL, 2009), mais análises experimentais de laboratório (WOLFF e DONATTI, 2016). A coleta de dados experimentais está embasada em tabelas elaboradas com variáveis comportamentais observadas à vontade no período preliminar de testes, tais como: comportamentos basais da espécie em aquários ausentes de tóxicos, alterações comportamentais com a presença de tóxicos. Além das observações prévias com as variáveis especificadas foram usados animais controles (branco) para comparações durante os períodos de ensaios.

A utilização dos dados desta pesquisa foram estruturados e apresentados em forma de tabelas e gráficos para favorecer melhor compreensão dos resultados. Ao término da análise, foi possível interpretá-los a partir de dois temas específicos, os quais foram: a) a determinação das faixas de letalidade a partir de testes de toxicidade aguda; b) a identificação dos principais sinais de alterações comportamentais nos animais provocados pelo tóxico estudado. Tais temáticas estão relacionadas com o conteúdo apresentado no referencial teórico e estabelecem pontes fundamentais para a compreensão dos objetivos.

## **6 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **6.1 SENSIBILIDADE DO TAMBAQUI PARA O DICROMATO DE POTÁSSIO-96h**

Conforme demonstrado na tabela 2, a análise de água apresentou valores coerentes, pois não ocorreu variações de valores que afetasse as condições de teste. Além de que, encontram-se de acordo com os parâmetros estabelecidos pela OCDE (1992) para testes de toxicidade aguda com peixes.

**Tabela 2** - Média dos valores dos parâmetros físico-químicos da água durante o ensaio de toxicidade aguda com dicromato de potássio (96h)

Parâmetros	Dicromato de Potássio
	Média ± Desvio Padrão
Temperatura (°C)	23.9 ± 0.4
pH	7.62 ± 0.07
Condutividade Elétrica (µs/cm)	279.63 ± 1.77
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	6.51 ± 0.01
Dureza Total (mg de CaCO <sub>3</sub> /L)	32.55 ± 2.55
Alcalinidade Total (mg de CaCO <sub>3</sub> /L)	154.5 ± 22.5
Amônia Total (mg/L)	0.13 ± 0.13

Fonte: Autoral, 2018

A Tabela 3, configura a distribuição de mortalidade de indivíduos durante o período do teste para as concentrações nominais da substância nos diferentes intervalos de tempo. Não houve morte no aquário branco (sem o tóxico).

**Tabela 3** - Distribuição da mortalidade dos juvenis no Teste de Toxicidade Aguda com dicromato de potássio (96h)

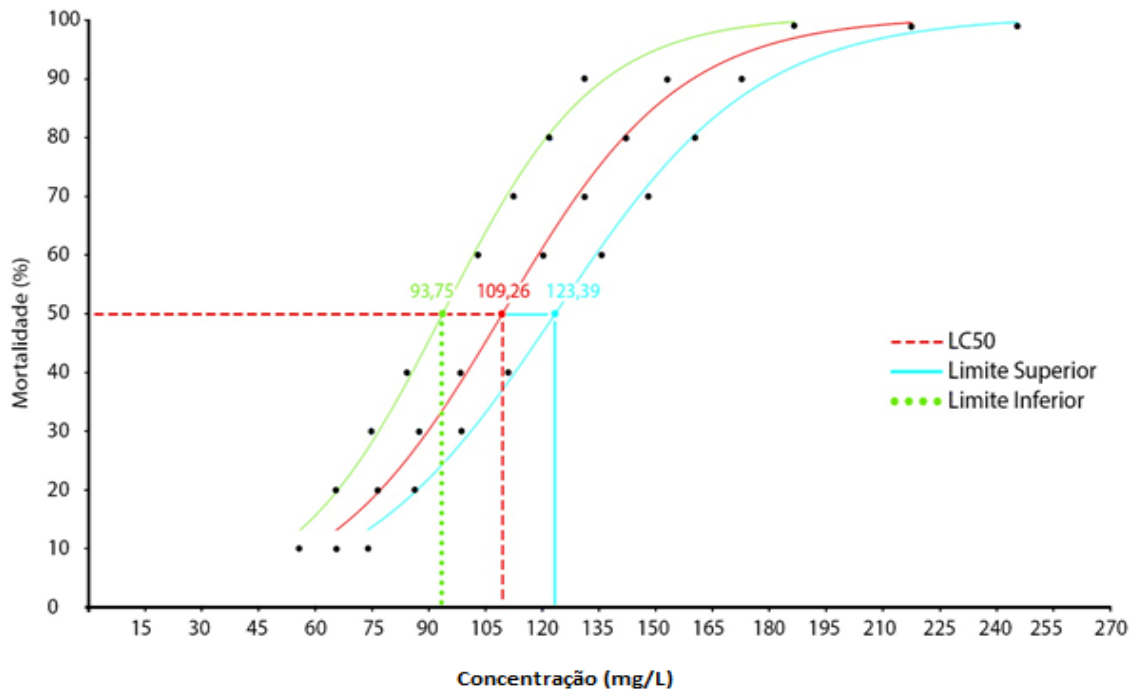
Concentração (mg/L)	Replicata	Período de Exposição (Horas)							
		2h	4h	8h	12h	24h	48h	72h	96h
0	1								
50	1								
	2								
	3								
100	1								1
	2							2	
	3							1	
125	1						2		
	2					1		1	1
	3						1	2	1
150	1					1	1	2	
	2					1	3	1	
	3						3	2	
215	1					1	1	3	
	2			1		1	3		
	3		1	1	1	2			

Fonte: Autoral, 2018

No presente estudo, obtivemos a CL<sub>50-96h</sub> de 109.26mg/L (limite superior de 123mg/L e inferior de 93.75mg/L) de dicromato de potássio para juvenis de tambaqui (Figura 8). Para calcular esta concentração foram considerados os limites do intervalo de confiança de 95%, por meio de uma regressão não-linear em função das concentrações nominais do tóxico para a mortalidade dos indivíduos através do ajuste de curva produzido pela equação:  $y = a / 1 + be^{-cx}$ .



**Figura 8** - Curva da concentração média letal do dicromato de potássio para 50% da população de juvenis, apresentando o limite superior e inferior do intervalo de confiança (95%). Desvio (S) = 0.51; R= 0.99.



Fonte: Programa Trimmed Spearman-Kärber®

Alguns estudos reportam sobre sensibilidades de espécies de peixes para o dicromato de potássio em testes de ecotoxicidade (Tabela 4).

**Tabela 4** - Valores de  $CL_{50}$  em Testes de Toxicidade Aguda com dicromato de potássio para espécies de peixes distintas

Espécies	$CL_{50}$ (mg/L)	Tempo de Exposição (h)	Referências Bibliográficas
<i>Poecilia reticulata</i>	50	24h	Cannavan (2009)
<i>Hemigrammus marginatus</i>	81	96h	Cetesb (1980) <i>apud</i> Zagatto e Bertoletti (2008, p.139)
<i>Danio rerio</i>	90	96h	Cetesb (1980) <i>apud</i> Zagatto e Bertoletti (2008, p.139)
<i>Cheirodon notomelas</i>	96	96h	Cetesb (1980) <i>apud</i> Zagatto e Bertoletti (2008, p.139)
<i>Hyphessobrycon eques</i>	130.79	96h	Da Cruz <i>et al.</i> , (2008)
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	144.50	96h	Da Cruz <i>et al.</i> , (2008)
<i>Phallocerus caudimaculatus</i>	154.39	96h	Da Cruz <i>et al.</i> , (2008)
<i>Colossoma mitrei</i>	156	96h	Cetesb (1980) <i>apud</i> Zagatto e Bertoletti (2008, p.139)
<i>Phallocerus caudimaculatus</i>	162.5	96h	Rosa <i>et al.</i> , (2013)

Continuação

<i>Poecilia reticulata</i>	175	96h	Cetesb (1980) <i>apud</i> Zagatto e Bertoletti (2008, p.139)
<i>Geophagus brasiliensis</i>	220	96h	Cetesb (1980) <i>apud</i> Zagatto e Bertoletti (2008, p.139)
<b><i>Colossoma macropomum</i></b>	<b>109.26</b>	<b>96h</b>	<b>Presente estudo</b>

Fonte: Compilação literária, 2018

Em estudo semelhante, Da Cruz *et al.*, (2008), avaliaram a sensibilidade de três espécies de peixes neotropicais (*Hyphessobrycon eques*, *Piaractus mesopotamicus* e *Phallocerus caudimaculatus*), para o dicromato de potássio, que apresentaram respectivamente as  $CL_{50-96h}$  de 130.79, 144.50 e 154.39mg/L. Estes pesquisadores destacam que tais espécies são sensíveis ao dicromato de potássio, e dentre estas encontra-se o pacu (*P. mesopotamicus*), eventual espécie parental próxima do tambaqui, e que apresentaram valor de sensibilidade aproximados.

Assim, comparando-se o valor de  $CL_{50}$  obtido neste estudo aos valores encontrados na literatura pode-se observar que o tambaqui em fase de juvenil apresentou sensibilidade tóxica satisfatória para ser usado como o organismo-teste neste estudo.

## 6.2 TOXICIDADE AGUDA DO PESTICIDA CLORPIRIFÓS PARA O TAMBAQUI-96H

A Tabela 5, configura a distribuição de mortalidade de indivíduos durante o período do teste para as concentrações nominais da substância nos diferentes intervalos de tempo. Não houve morte no aquário branco (sem o tóxico).

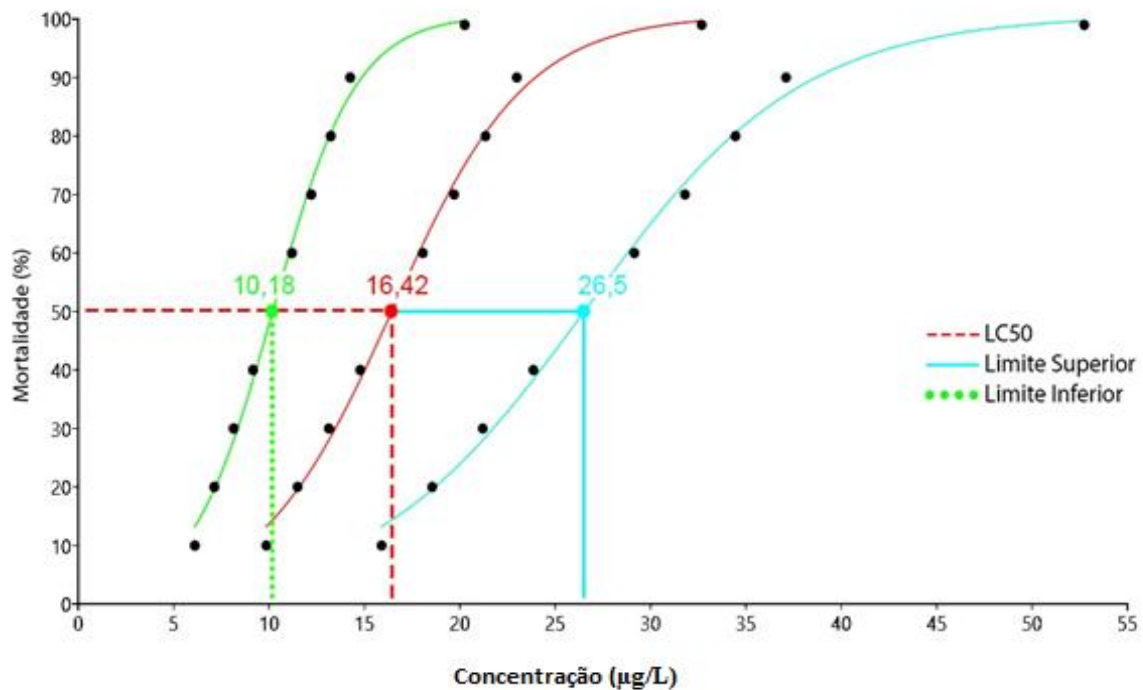
**Tabela 5** - Distribuição da mortalidade de juvenis no Teste de Toxicidade Aguda com o pesticida clorpirifós (96h)

Concentração ( $\mu\text{g/L}$ )	Replicata	Período de Exposição (Horas)									
		2h	4h	6h	8h	12h	24h	48h	72h	96h	
0	1										
2.5	1									1	
	2								1		
	3								1		
10	1								1		
	2							1	1	2	
	3										
15	1								1		
	2							1			
	3					1	1	1			
25	1					1	1		2		
	2						1	1			
	3						1	3	1		
45	1					2	2	1			
	2						2	1	1	1	
	3						3	1		1	

Fonte: Autoral, 2018

No presente estudo, obtivemos a  $CL_{50-96h}$  de 16.42  $\mu\text{g/L}$  (limite superior de 26.5 $\mu\text{g/L}$  e inferior de 10.18 $\mu\text{g/L}$ ) de clorpirifós para juvenis de tambaqui (Figura 9). Para calcular esta concentração foram considerados os limites do intervalo de confiança de 95%, por meio de uma regressão não-linear em função das concentrações nominais do tóxico para a mortalidade dos alevinos através do ajuste de curva produzido pela equação:  $y = a / 1 + be^{-cx}$ .

**Figura 9** - Curva da concentração média letal do pesticida clorpirifós para 50% da população de juvenis, apresentando o limite superior e inferior do intervalo de confiança (95%). Desvio (S) = 0.38; R = 0.98.



**Fonte:** Programa Trimmed Spearman-Kärber®

A  $CL_{50-96h}$  encontrada neste estudo para o tambaqui em fase juvenil foi menor que os valores reportados para outras espécies como: *Oreochromis mossambicus* (RAO *et al.*, 2003), *Oreochromis niloticus* (MAJUMDER e KAVIRAJ, 2018), *Gambusia yucatanana* (RENDÓN-VON *et al.*, 2005), *Cyprinus carpio* (LI *et al.*, 2013), *Poecilia reticulata* (SHARBIDRE, METKARI e PATODE, 2011), *Cnesterodon decemmaculatus* (PARACAMPO *et al.*, 2014), e outras demais.

Porquanto, comparando-se a  $CL_{50}$  obtida neste estudo aos valores encontrados na literatura pode-se inferir que o tambaqui em fase de juvenil apresentou importante sensibilidade tóxica ao pesticida clorpirifós.

**Tabela 6** - Valores de CL<sub>50</sub> em Testes de Toxicidade Aguda do clorpirifós para espécies de peixes distintas

<b>Espécies</b>	<b>CL<sub>50</sub> (µg/L)</b>	<b>Tempo de Exposição (h)</b>	<b>Referências Bibliográficas</b>
<i>Clarias gariepinus</i>	0.5	96h	Woke e Aleleye-wokoma (2009)
<i>Clarias gariepinus</i>	1.0	72h	Woke e Aleleye-wokoma (2009)
<i>Clarias gariepinus</i>	2.0	24h	Woke e Aleleye-wokoma (2009)
<i>Oreochromis mossambicus</i>	25.97	96h	Rao <i>et al.</i> , (2003)
<i>Oreochromis niloticus</i>	42	2h	Majumder e Kaviraj (2018)
<i>Oreochromis niloticus</i>	47	96h	Majumder e Kaviraj (2018)
<i>Oreochromis mossambicus</i>	82	96h	Kunjamma <i>et. al.</i> , (2008)
<i>Gambusia yucatanana</i>	85	96h	Rendón-von <i>et al.</i> , (2005)
<i>Oreochromis niloticus</i>	90	2h	Majumder e Kaviraj (2018)
<i>Oreochromis niloticus</i>	98.67	96h	Oruç (2010)
<i>Cnesterodon decemmaculatus</i>	105.3	96h	Paracampo <i>et al.</i> (2014)
<i>Oreochromis niloticus</i>	109	96h	Majumder e Kaviraj (2018)
<i>Pimephales promelas</i>	140	96h	Roex, De Vries e Van Gestel (2002)
<i>Cyprinus carpio</i>	149	96h	Li <i>et al.</i> , (2013)
<i>Gambusia affinis</i>	150	96h	Boone e Chambers (1996)
<i>Oreochromis niloticus</i>	154.01	96h	Oruç (2010)
<i>Cyprinus carpio</i>	160	96h	Ramesh e David (2009)
<i>Poecilia reticulata</i>	176	96h	Sharbidre, Metkari e Patode (2011)
<i>Pimephales promelas</i>	200	96h	Belden e Lydy (2006)
<i>Pimephales promelas</i>	203	96h	Holcombe <i>et al.</i> , (1982) <i>apud</i> Tilak, Veeraiah e Rao (2004)
<i>Rutilus rutilus</i>	250	96h	Douglas e bell (1990) <i>apud</i> Tilak, Veeraiah e Rao (2004)
<i>Ictalums punctatus</i>	280	96h	Johnson e Finley (1980) <i>apud</i> Tilak, Veeraiah, Rao (2004)
<i>Gambusia affinis</i>	297	96h	Kavitha e Rao (2008)
<i>Gambusia affinis</i>	298	96h	Rao <i>et al.</i> , (2005)
<i>Oryzias latipes</i>	300	48h	Carlson <i>et al.</i> , (1998)
<i>Gambusia affinis</i>	340	96h	De silva e Samayawardhena (2002)
<i>Danio rerio</i>	430	240h	Kienle, Köhler e Gerhardt (2009)
<i>Cirrhinus mrigala</i>	440	96h	Bhatnagar, Yadav e Cheema (2016)
<i>Gambusia affinis</i>	520	96h	Varó <i>et al.</i> , (2000)
<i>Anguilla anguilla</i>	540	96h	Ferrando, Sancho e Andreu-Moliner (1991)
<i>Carassius auratus</i>	542	96h	Holcombe (1985) <i>apud</i> Tilak, Veeraiah e Rao (2004)
<i>Cyprinus carpio</i>	582	96h	Hing <i>et al.</i> , (2012)
<i>Pimephales promelas</i>	806	96h	Holcombe (1985) <i>apud</i> Tilak, Veeraiah e Rao (2004)
<i>Channa punctatus</i>	811.98	96h	Ali <i>et. al.</i> , (2009)
<i>Clarias gariepinus</i>	860	96h	Nwani <i>et al.</i> , (2013)
<i>Clarias gariepinus</i>	1030	72h	Nwani <i>et al.</i> , (2013)
<i>Clarias gariepinus</i>	1300	48h	Nwani <i>et al.</i> , (2013)
<i>Oreochromis niloticus</i>	1570	96h	Gül (2005)
<i>Clarias gariepinus</i>	1660	24h	Nwani <i>et al.</i> , (2013)
<i>Poecilia reticulata</i>	1790	96h	Selvi <i>et al.</i> , (2005)
<i>Poecilia reticulata</i>	8480	96h	Sharbidre, Metkari e Patode (2011)
<i>Clarias macrocephalus</i>	33000	96h	Chawanrat <i>et al.</i> , (2007)
<b><i>Colossoma macropomum</i></b>	<b>16.42</b>	<b>96h</b>	<b>Presente estudo</b>

**Fonte:** Compilação literária, 2018

Além disso, é possível perceber variações nos valores de toxicidade para uma mesma espécie. Segundo Oruç (2010) e Majumder e Kaviraj (2018), peixes de uma mesma espécie podem apresentar tolerâncias diferentes correlacionadas com a idade do animal usado no teste.

Segundo Baird e Brink (2007), e de acordo com Woke e Aleleye-Wokoma (2009), fatores como, tamanho, estágio de vida, e ainda comportamento alimentar; além do modo de respiração dos organismos-teste, pode influenciar nas diferenças de respostas de sensibilidades de uma mesma espécie para os xenobióticos. Com isso, vale ressaltar, a importância de estudos ecotoxicológicos abrangendo diferentes fases representativas de ciclo de vida dos peixes (embrião, larva, juvenil e adulto) para este pesticida.

### 6.3 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA ÁGUA NO ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA COM CLORPIRIFÓS

O monitoramento das características físico-químicas do meio de diluição em testes de toxicidade se faz necessário, pois ameniza interpretações equivocadas pelas respostas dos organismos (BERTOLETTI, 2009). Seguindo orientações da OCDE foram feitas medições de alguns dos parâmetros físico-químicos da água de diluição dos testes em todas as etapas, onde os padrões de qualidade da água se mostraram adequados para a aplicação dos testes (Tabela 7).

**Tabela 7** - Média dos valores dos parâmetros físico-químicos da água durante o ensaio de toxicidade aguda com o pesticida clorpirifós (96h)

Parâmetros	Clorpirifós
	Média ± Desvio Padrão
Temperatura (°C)	24.6 ± 0.47
pH	7.6 ± 0.01
Condutividade Elétrica (µs/cm)	467.63 ± 2.27
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	6.60 ± 0.05
Dureza Total (mg de CaCO <sub>3</sub> /L)	15 ± 3.36
Alcalinidade Total (mg de CaCO <sub>3</sub> /L)	18 ± 3.84
Amônia Total (mg/L)	0.09 ± 0.06

**Fonte:** Autoral, 2018

A literatura reporta sobre capacidade de destoxificação, salientando que em indivíduos mais jovens o processo ocorre mais facilmente (BERTOLETTI, 2009; MAJUMDER e KAVIRAJ, 2018). Considerando relatos de Souza (2014), a elevada temperatura da Amazônia pode contribuir para rápida biotransformação destes xenobióticos nos organismos, levando-lhes à ligeira desintoxicação, mas, são necessários estudos aprofundados visando a toxicocinética dessas substâncias sobretudo nos trópicos.

O potencial hidrogeniônico (pH) da água foi ajustado com antecedência nos testes, e se manteve dentro da faixa de tolerância recomendada pela OECD (1992) para testes agudos e dentro dos padrões aconselhados por Aride, Roubach e Val (2007), para o tambaqui. Outrossim, para estes mesmos autores, a espécie costuma tolerar variações de pH, isso tem se demonstrado em cativeiros, entretanto, seu maior crescimento se dá em pH ácido entre 4 e 6.

A temperatura do ambiente climatizado foi mantida entre 24 e 26°C, e a água apresentou entre 23 a 25°C, o que para Mendonça *et al.*, (2009) é considerada uma faixa tolerável para peixes tropicais. Isso porque, o aumento na temperatura da água, pode influenciar na toxicidade do agente químico (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008), ademais, este composto possui estabilidade a 25°C, e sua solubilidade em água é ideal a 24°C. De acordo com Ranzani-Paiva *et al.*, (1999), esta espécie, tem seu crescimento afetado em temperaturas abaixo de 22°C, e pode sofrer morte abaixo de 16°C.

Os níveis de oxigênio dissolvido foram mantidos em torno de 6,5mg/L, e pelos limites estabelecidos na OECD (1992) estão condizentes com as exigências para testes em laboratórios, ou seja, maior que 4mg/L. Esta condição foi favorecida pelo uso de oxímetros para homogeneizar a oxigenação e amenizar o estresse pela água. Araújo-Lima e Gomes (2005), destacam que esta espécie cresce normalmente em ambientes com níveis de oxigenação a 3mg/L. Além disso, esta espécie pode resistir à hipóxia sob condições extremas de níveis de oxigênio na água, menores que 1mg/L, isso é possível pela estratégia de expandir seu lábio inferior (protrusão) e buscar nas camadas mais superficiais captar e direcionar para as brânquias, a água com mais oxigênio (ARAÚJO-LIMA e GOULDING, 1998; BALDISSEROTO, 2002).

A amônia apresentou valores coerentes em todas as unidades experimentais, muito próximos aos valores apresentados pelo controle (branco), pois se manteve abaixo dos 0.46mg/L de amônia não ionizada recomendados por Ismiño-Orbe, Araujo-lima e Gomes (2003) e Souza-bastos, Val e Wood (2016), e de 0.69mg/L determinada por Marcon *et al.*, (2004). Esta é uma espécie onívora que comumente não consome alimentos ricos em nitrogênio (como espécies carnívoras), por isso, naturalmente possui baixa excreção de amônia (ISMIÑO-ORBE, ARAUJO-LIMA e GOMES, 2003). Além do que, isso pode ser explicado pela disposição dos animais no aquário em jejum antecipado. Nas quatro horas iniciais, houve maior acúmulo de dejetos sólidos (resíduos fecais) pelo grupo controle (sem o tóxico), corroborando com Souza-Bastos, Val e Wood (2016), e também nas concentrações menores (2.5 e 10µg/L). Vale mencionar, que esta resposta aparentemente se diferenciou nas concentrações acima de 15µg/L,

onde o volume de dejetos diminuíram, sugerindo um indicativo de resposta compensatória relacionada ao estresse ou à destoxificação diminuída, e tal evidência demonstra que são necessárias mais investigações sobre esses possíveis efeitos.

#### 6.4 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CLORPIRIFÓS NO COMPORTAMENTO, DURANTE OS ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA

##### **6.4.1 Etograma para a espécie *Colossoma macropomum* com repertórios de comportamentos observados em aquários isentos de tóxicos**

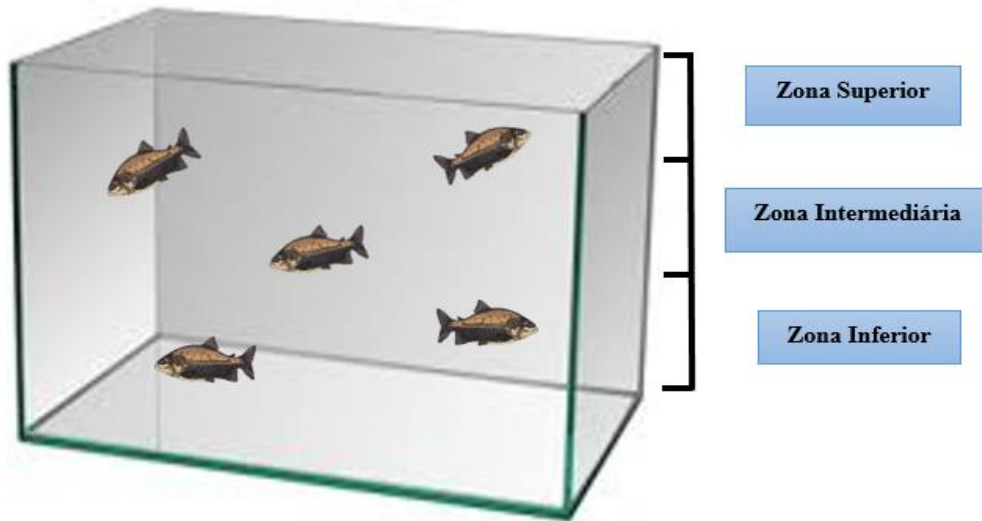
Estudos etológicos em ambiente natural possuem informações que podem ser relacionadas com as condições do hábitat e nicho ecológico, mas as variáveis ambientais geralmente não encontram-se sob controle (SABINO, 2000). No entanto, estudos realizados em ambientes controlados, oferecem condições de observações por períodos mais prolongados, além de favorecer o controle das variáveis ambientais (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

O tambaqui, apesar de ser uma espécie de peixe amazônica muito estudada, ainda possui poucos relatos literários acerca de seus comportamentos nas natureza, alguns estudiosos como: Araujo-Lima e Goulding, (1997), Tundisi (2008), Santos (2010), Carvalho *et al.*, (2014), permitem conhecer um pouco sobre o nicho ecológico deste caracádeo no ambiente natural, todavia, em condições laboratoriais são consideradas escassas as descrições.

Segundo Gouveia Jr. *et al.*, (2006), à grosso modo, “é considerado comportamento em peixes todo ato motor do animal”. De acordo com Wolff e Donatti (2016), são esses comportamentos que norteiam a manutenção e/ou interação de sobrevivência da espécie no meio em que encontra-se inserida; e pode servir de base para as circunstâncias estudadas neste estudo. Desse modo, foram observados alguns padrões comportamentais típicos de juvenis, observados em aquários. Baseado nos resultados qualitativos preliminares, algumas das posturas destes indivíduos, ajudaram a traçar de maneira rápida o perfil ou roteiro biológico (etograma) nesta etapa do trabalho, que foram importantes para o prosseguimento deste estudo.

A figura 10 mostra o esquema ilustrativo de divisão do aquário em três zonas portuárias: Inferior, intermediária e superior. Cada uma destas zonas possui  $\pm 8$  cm, já que a coluna total mede 25 cm de altura. Este modelo de divisão foi adaptado de Wolff e Donatti (2016), para facilitar a interpretação visual durante a coleta dos dados.

**Figura 10** - Imagem ilustrativa sobre as divisões imaginárias da coluna d'água no aquário



**Fonte:** Autoral, 2018

A priori, percebeu-se um padrão de estar dos juvenis na coluna d'água, conforme descritos na Tabela 8. É importante enfatizar que, foram eventos observados casualmente, e considerados de acordo com a sua frequência notória. Por isso, são parâmetros compartilhados pela maioria dos indivíduos do grupo com elevadas repetições nos períodos observacionais, pois estes encontravam-se em número de cinco indivíduos no aquário.

**Tabela 8** - Descrição do padrão de estar dos juvenis na coluna d'água quando encontram-se dispostos em aquário

**Zona Inferior (ZIF):** No contato inicial com o ambiente, os juvenis, exploram esta zona demonstrando excitação de nado, e por conseguinte, costumam permanecer aglomerados com nado estacionário, em situações, de repouso, e de forrageio. Normalmente, quando estes sofrem perturbações aparentam aumento de motilidade, e de maneira precipitada, migram para as outras zonas.

**Zona Intermediária (ZIT):** Nesta zona da coluna d'água os animais costumam transitar ou permanecer em situações de nado em repouso (estacionário), e geralmente, não apresentam aglomerações. Depois da zona inferior, este é o ponto mais frequentado pelos animais em estado estacionário. Além disso, é normalmente nesta região da coluna d'água que ocorrem a maioria das interações agonistas observadas (perseguição, luta, fuga).

**Zona Superior (ZSP):** No primeiro contato com o ambiente, esta zona é bastante explorada, mas, subsequentemente, torna-se, a menos frequentada na coluna d'água. Em contrapartida, em situações de estresse respiratório, estes animais costumam migrar preferencialmente para esta zona, e podem permanecer por períodos prolongados.

**Fonte:** Autoral, 2018

Quando encontram-se na natureza, em rios (ambientes lóticos), esses animais (bento pelágicos), costumam repousar próximos à substratos como estratégia de reduzir o fluxo da água e conseguir amenizar os gastos energéticos na manutenção, seja pelo nado em buscas de alimentos, ou pela migração em grandes correntezas (ARAUJO-LIMA e GOULDING, 1997). Além disso, Tundisi (2008), afirma que esta espécie quando jovem costuma alimentar-se

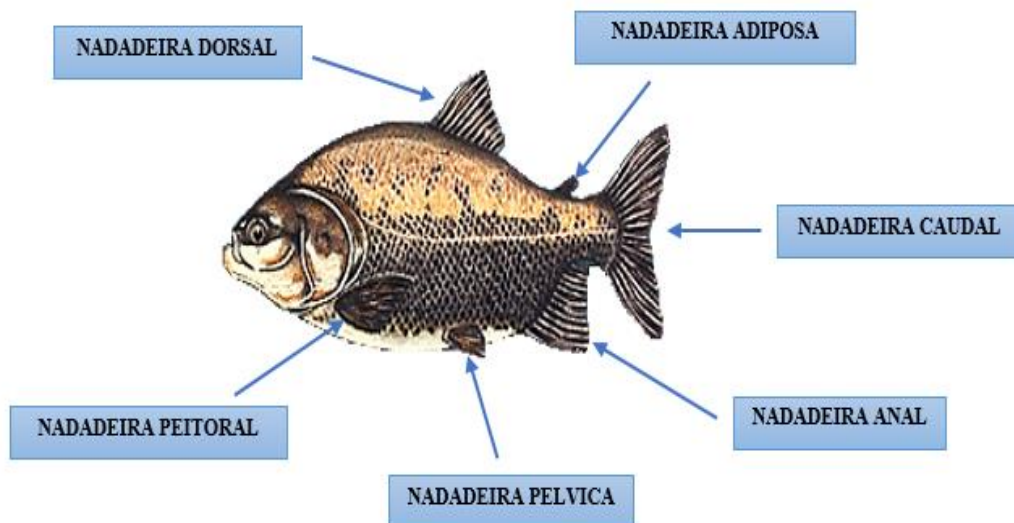


principalmente de zooplanktons, que por sua vez, migram durante o dia para as profundezas das águas (região bentônica) e à noite reaparecem na superfície. Ademais, este autor pressupõe que o comportamento social instintivo de agregar-se em cardume é comumente visto em indivíduos desta espécie, mas à medida que crescem tornam-se competitivos e deixam o hábito.

A fim de obter mais informações sobre o roteiro biológico deste modelo estudado, as observações abrangeram também as unidades comportamentais de padrão natatório, e interações agonistas. Os comportamentos de nado desta espécie, podem, muitas vezes, ser vistos e comparados com os de outras espécies na literatura, assim como nos estudos de Henriques (1997), Sabino (2000) e Igushi (2012).

O padrão natatório dos peixes está relacionado com a morfologia do indivíduo, deste modo, as nadadeiras do animal modelo estão destacadas na figura 11, estas estruturas natatórias, consequentemente auxiliam no equilíbrio e deslocamento do animal na coluna d'água.

**Figura 11** - Morfologia natatória do *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818)



**Fonte:** Adaptado de Deo (2014)

Para abordar algumas características comportamentais basais relacionadas à esta espécie, foi elaborado um etograma, com um rápido levantamento sobre repertórios de padrão de nado dos peixes no aquário sem a presença do toxicante. Foram observadas unidades de motilidade ou tipos de natação (Tabela 9).

**Tabela 9** - Descrição do padrão de natação (equilíbrio e deslocamento) dos juvenis na coluna d'água quando encontram-se dispostos em aquário

<p><b>Nado Estacionário na Coluna d'água:</b> Em postura de repouso, o juvenil “balança” sua cauda e nadadeiras anal e dorsal, e para manter-se estagnado, este “rema” com suas nadadeiras ventrais (peitorais e pélvicas) de fora para dentro. Não são percebidos movimentos ondulatórios corporais como no caso de deslocamentos.</p>
<p><b>Nado Estacionário no Fundo:</b> O juvenil abanca-se no fundo do aquário, ancorando-se pela região ventral e nadadeiras pélvicas, para conseguir manter-se estático, este “balança” sua cauda e nadadeiras anal e dorsal, e de forma alternada e lenta este “rema” de fora para dentro com suas nadadeiras peitorais e pélvicas.</p>
<p><b>Natação para Frente:</b> Para deslocar-se na coluna d'água o juvenil enfatiza os movimentos da metade posterior do seu corpo. Onde “balança” sua cauda e, nadadeiras, anal e dorsal, e “rema”, alternadamente, com as nadadeiras ventrais (peitorais e pélvicas) de fora para dentro. Simultaneamente, este apresenta movimentos corporais ondulatórios. O percurso é intercalado por batimentos das nadadeiras com forte amplitude e rápidas pausas para deslizar o nado.</p>
<p><b>Natação Rápida para Frente:</b> O juvenil realiza os batimentos rápidos de suas nadadeiras ventro-dorsais alternados com uma rápida pausa para deslocar-se em posição de mergulho veloz, que por sua vez, pode ser mais duradouro ou rápido, de acordo com a distância percorrida.</p>
<p><b>Natação de Ré:</b> O juvenil “balança” suas nadadeiras caudal e anal, com movimentos bilaterais e discretos enquanto “rema”, abruptamente, tanto com a nadadeira dorsal para o lado direito, quanto com as ventrais (peitorais e pélvicas) de dentro para fora, direcionando o nado para trás.</p>
<p><b>Natação Lateral com Mudança Abrupta de Direção:</b> O juvenil perfaz uma mudança rápida de direção ao parar de movimentar suas nadadeiras, imediatamente, movimentando a cabeça para a lateral, seguido de movimentos corporais abruptos (musculoesquelético), e a cauda finaliza a manobra como um “leme”.</p>
<p><b>Natação Lateral com Mudança Lenta de Direção:</b> O juvenil sinaliza com a cabeça para o lado à medida que também vai realizando os movimentos brandos de suas nadadeiras, semelhante ao nado para frente. Este demonstra reforçar a direção de nado com a manobra corporal e os batimentos da cauda em maior frequência.</p>
<p><b>Natação Superior Oblíqua:</b> O juvenil alavanca o seu nado partindo de um ponto inferior para outro superior, inclinando intencionalmente o seu corpo e sua cabeça sempre relativamente orientada para cima, este inicia o movimento de deslocamento oblíquo utilizando as mesmas nuances da natação para frente, em deslocamento de curta ou longa distância.</p>
<p><b>Natação Superior Vertical:</b> O juvenil realiza o ato de subir em posição vertical a partir de um ponto inferior, mantendo sua cabeça sempre orientada para a superfície, demonstrando maior batimento das nadadeiras caudal e dorsal, garantindo o impulso e o deslize corporal na coluna d'água. É percebido um deslocamento de subida mais lento devido a aproximação da zona de tensão superficial aquática.</p>
<p><b>Natação Superior Flutuada:</b> O juvenil desloca-se para um ponto superior próximo, sem realizar os batimentos das nadadeiras, apenas mantendo seu movimento peristáltico do musculoesquelético, percebe-se que este sobe gradativamente, por vezes pode ocorrer movimentos intervalares sutis das nadadeiras se a distância for prolongada. Neste padrão, o juvenil é percebido em maior frequência na posição de nado estacionário.</p>
<p><b>Natação Inferior Oblíqua:</b> O juvenil realiza as performances semelhantes ao nado superior oblíquo mas desloca-se na direção contrária à esse, de um ponto superior para outro inferior, mantendo sua cabeça orientada para baixo.</p>
<p><b>Natação Inferior Flutuada:</b> O juvenil simplesmente deixa de movimentar suas nadadeiras caracterizando-se pelo nado estacionário, porém, inicia uma descida gradativa na vertical com o corpo retilíneo, ou seja, é uma performance no sentido contrário ao nado superior flutuado. Pode ser percebido com maior frequência quando este encontra-se em posição de nado estacionado.</p>
<p><b>Natação Excitatória de Exploração Inicial:</b> O juvenil ao entrar em primeiro contato com o ambiente perfaz nuances com excitabilidades temporárias, inclinando-se em posição oblíqua, apoiando, parcialmente, a região ventral/frontal de sua cabeça no fundo do aquário, realizando deslizes para frente ou para trás, aparentando movimentos frenéticos e de forrageio efêmero; por vezes, ocorre episódios com pequenos saltos com trocas de posição instantâneas. Durante este padrão comportamental a respiração oro-branquial torna-se acelerada (aumento da frequência de movimento opercular), e pode permanecer por algum tempo.</p>
<p><b>Rivalidade de Auto Reflexo:</b> O juvenil encontra-se confinado em um aquário de vidro transparente (ambiente “espelhado”) e ao aproximar-se das paredes, visualiza o seu reflexo, e demonstra curiosidade em existir um outro suposto espécime na imagem estampada. Geralmente este esboça a reação de explorar (especulando) insistentemente sua autoimagem, e isto ocorre frequentemente no primeiro contato com o ambiente, e posteriormente, este padrão comportamental torna-se esporádico.</p>

De acordo com as disposições dos animais em grupo, foi possível observar episódios casuais de interações sociais, considerados de suma importância para a manutenção destes indivíduos, sendo observados também em outros estudos com peixes de outras espécies (HENRIQUES, 1997; TEREZA e GONÇALVES-DE-FREITAS, 2003; GOUVEIA JR. *et al.*, 2006; WOLFF e DONATTI, 2016). Alguns desses comportamentos foram observados, filmados e descritos (Tabela 10).

**Tabela 10** - Descrição de interações agonistas dos juvenis na coluna d'água quando encontram-se em aquário

<p><b>Perseguição:</b> Pode ser observada quando existe fuga porque são situações responsivas relativamente diretas. Percebe-se que um mesmo juvenil pode deixar de perseguir um indivíduo para perseguir outro, e por vezes, o perseguidor pode torna-se o perseguido. Outrossim, um único juvenil pode realizar, por vezes, sucessivas perseguições a distintos coespecíficos. Além disso, um espécime maior pode perseguir outro menor. Percebeu-se que nesta ação, por vezes, pode ocorrer uma breve parada, e de imediato pode recomeçar o episódio.</p>
<p><b>Ameaça:</b> Pode ser representada apenas pela aparição proximal do seu oponente, sem emissão de ataque, e o ameaçado, foge, imediatamente. Ou ainda, o ameaçador, pode ser percebido pelo ameaçado ao longe, e ao tentar aproximar-se para rivalizar, o ameaçador não espera este chegar perto, fugindo imediatamente.</p>
<p><b>Fuga:</b> É uma reação contrária à perseguição, onde, o perseguido afasta-se em direção contrária à seu oponente, afastando-se mais rapidamente. No percurso dependendo da distância pode ocorrer mudanças bruscas de direção natatória.</p>
<p><b>Fuga em cardume:</b> No instante em que os juvenis encontram-se aglomerados com nado estacionário e pressentem estímulos alheios costumam afastar-se, rapidamente, quase sempre esses indivíduos migram em grupo, na direção oposta às suas últimas posição no aquário. Geralmente um dos animais iniciam a fuga seguido pelos outros imediatamente.</p>
<p><b>Canibalismo:</b> Foi observado, episodicamente, o comportamento canibal em juvenis. Onde, o indivíduo dominante explora e ataca àquele indivíduo coespecífico que aparenta estar mais frágil, com algum sinal de desequilíbrio natatório, e que apresente dificuldade de escape, ou esteja morto. Primeiramente, o peixe “canibal”, agride com mordidas, e arrasta propositalmente a presa sacudindo-a para dilacerar fragmentos das nadadeiras e em seguida ingere-os.</p>
<p><b>Luta:</b> É iniciada, geralmente, pela proximidade dos indivíduos envolvidos, e comumente após exhibições de ameaça. Existem inúmeros rituais de lutas praticadas por esses animais, que podem ser marcados por um panorama de contato corporal e agressão de ambos os oponentes, ou apenas da parte de um.</p>
<p><b>Luta boca-boca:</b> Ocorre quando dois juvenis, justapostos, se empurram boca-boca, ou apenas, um destes é empurrado pelo oponente, esta ação é realizada, rapidamente. Por vezes, pode existir mordidas na boca durante o ataque.</p>
<p><b>Luta boca-lateral:</b> Ocorre quando um oponente empurra com a boca a região têmporo-parietal da cabeça ou da parte posterior corporal do seu rival. Pode ser um ataque unilateral ou bilateral, onde, neste último, o indivíduo passa por cima do agredido, e repete a agressão no outro lado, e vice-versa.</p>
<p><b>Cabeça-cabeça:</b> Ocorre quando os dois juvenis se emparelham cabeça com cabeça, demonstrando rivalidade, e pode haver, sequências rápidas, de fortes empurrões lateralmente, afastando seu oponente.</p>
<p><b>Meia volta e luta:</b> Ocorre quando os dois oponentes se rodeiam, tanto para o sentido horário como para o anti-horário, e quando estes completam meia volta, tendem a se esbarrar, e acontecer empurrões, dentre outros ataques como, boca-boca, boca-lateral, cabeça-cabeça, entre outros.</p>
<p><b>Uma volta e luta:</b> Ocorre quando os dois oponentes se rodeiam, e quando realizam uma volta completa estes iniciam episódios de agressão, com empurrões boca-boca, boca-lateral, cabeça-cabeça, entre outros.</p>
<p><b>Uma volta completa/meia volta contrária e luta:</b> Neste episódio ocorre uma volta completa e meia volta contrária, e isso pode acontecer, quando os dois oponentes se rodeiam em sentido horário ou anti-horário, e de imediato, estes retomam o rodeio no sentido oposto, ao final de meia volta, iniciam ou retomam agressões corporais casuais.</p>

**Fonte:** Autoral, 2018

#### 6.4.2 Efeitos do dicromato de potássio sobre o comportamento de tambaqui em 96h de exposição

Durante os ensaios foram extraídas informações de efeitos comportamentais que foram provocados pela exposição ao agente tóxico durante o período experimental. Dadas as suas ocorrências casuais, esses danos foram mais percebidos com o aumento das concentrações, e geraram uma sequência de eventos elencados e descritos na tabela 11.

**Tabela 11** - Eventuais estágios comportamentais dos juvenis de tambaqui frente à exposição ao dicromato de potássio durante o Teste de Sensibilidade (96h)

0.	Animal sem efeitos tóxicos, apresentando comportamentos normais ao seu padrão natatório.
1.	À priori, o animal pode apresentar, alteração na respiração oro-branquial (acelerada, com movimentos operculares acelerados) e ainda, ocorrer aumento de sua motilidade para as zonas intermediária e superior, aparentando nado contínuo com movimentos rápidos e abruptos do corpo e das nadadeiras;
2.	O animal passa a apresentar nado estacionário com movimentos caudais oscilatórios (“sacudidelas”) caudal e déficit de motilidade na coluna d’água, esporadicamente migrando temporariamente para a zona superior, permanecendo nesta zona por mais tempo. A partir desta etapa (padrão comportamental), pode ser observada alteração na coloração da superfície corporal com a presença de escurecimento;
3.	O animal pode apresentar perda de equilíbrio natatório, sua respiração oro-branquial fica menos acelerada e, pode ser observada a protrusão labial. Além disso, podem ser percebidos nesta etapa giros e rodopios na superfície, ou episódios de comportamento oscilatório (saltos) de alta excitabilidade, caracterizando-se como respostas de estresse respiratório. Existem casos de convulsão a partir deste ponto;
4.	O animal pode apresentar nado errático persistente e respiração oro-branquial fica mais lenta, ocorre a perda súbita do padrão natatório, caracterizado pela incorreção do nado deste durante o deslocamento na coluna d’água, com movimentos desorientados de nado;
5.	O animal pode apresentar paralisia com respiração oro-branquial desregulada, com oscilação (ora aumentando, ora diminuindo). Além disso, há aumento de sensibilidade à estímulos externos, que resulta em excitações natatórias momentâneas com atenuados impulsos de movimentos irregulares de nado;
6.	O animal pode apresentar convulsão esporádica e casual demonstrando desacertos de deslocamentos e contorções no corpo, apresentando deslocamento atenuado, fazendo rodopios irregulares com nado rápido em círculos, simultaneamente à episódios espasmódicos, apresentando respiração oro-branquial lenta;
7.	O animal pode apresentar paralisia momentânea ou prolongada, aparentando perda total do equilíbrio natatório, por vezes, ficando condicionado a ser deslocado predominantemente pela corrente de fluxo da aeração artificial presente no aquário, e frequentemente chega a tombar no fundo do aquário sem esboçar movimento das nadadeiras, apresentando batimento opercular acelerado;
8.	O animal cessa os movimentos de suas nadadeiras peitorais, e restam vestígios de respiração oro-branquial, e sua homeostase é encerrada provocando sua morte.

Fonte: Autoral, 2018

No decorrer dos ensaios, os efeitos deletérios puderam ser observados mais intensamente nas maiores concentrações, como alterações comportamentais de respiração oro-branquial acelerada e indivíduos estáticos, que indicavam estresse pela exposição ao tóxico, já nas primeiras horas. Nos intervalos entre 24 e 72 horas, foi verificado maior quantitativo de mortes. Em contrapartida, a concentração de 50mg/L, não causou nem uma morte e nenhum espécime do grupo branco morreu nas 96 horas de ensaio. As respostas de alterações comportamentais puderam ser observadas por tempos maiores de exposição nas concentrações

mais baixas (125, 100 e 50mg/L), pois nas concentrações mais altas (215 e 150mg/L), provocou a morte nos animais em tempos menores.

Efeitos como estresse respiratório foi percebido pela permanência dos animais na zona superior, demonstrando respiração de superfície por tempos prolongados, incluindo eventuais perdas de equilíbrio, acompanhadas de, nado errático, afundamento, paralisias, convulsões e letargias. Segundo Baldisseroto (2002), a hiperventilação branquial concomitante com a exposição do peixe na superfície, ocorre pela tentativa deste em aumentar esforçadamente sua ventilação branquial, e esta alternância permite subterfúgio ao animal em baixas concentração de oxigênio na água. Carvalho e colaboradores (2014), reportaram que, o alargamento do lábio inferior do tambaqui se desenvolve pela alta tolerância à hipóxia nos ambientes de inundações e secas, como estratégia que permite melhor desempenho na respiração da região superficial aquática mais rica em oxigênio.

Freches (2015), publicou no trabalho intitulado “os efeitos ecológicos de substâncias químicas: uma nova perspectiva sobre velhas ferramentas”, efeitos crônicos em *Daphnia magna* (invertebrados) pela exposição prolongada à esta substância (dicromato de potássio), bem como investigaram a transitoriedade destes efeitos para a geração precedente. Com isso, puderam identificar a nocividade deste tóxico na reprodução, quando causou diminuição da população descendente nas concentrações a partir de 5 µg/L. Estes autores extrapolaram seus resultados para o meio ambiente mostrando relevância de doses baixas deste composto na contaminação presente principalmente nas águas superficiais. Além disso, estes projetam seus resultados fazendo menção aos vários processos de biotransformação e bioacúmulo que este produto está sujeito no ambiente aquático.

Vale ressaltar, que neste estudo foram observadas alterações comportamentais em juvenis de tambaqui as quais não encontra-se na reportadas na literatura informações semelhantes em peixes para esta substância dicroomato de potássio. Além disso, não são encontradas investigações sobre sua toxicocinética *in vivo*, apesar de ser utilizada como referência de toxicidade para em bioensaios com organismos aquáticos.

Assim, pode-se reiterar que são necessárias avaliações sobre a toxicidade deste tóxico para organismos aquáticos, bem como para os peixes, visto a importância que estes indivíduos representam para as comunidades dos ecossistemas hídricos expostos à contaminações.

### 6.4.3 Efeitos do clorpirifós (48%) sobre o comportamento de tambaqui em 96h de exposição

Durante a aplicação dos ensaios com o pesticida foram observadas e anotadas alterações comportamentais em todas as unidades experimentais de cada concentração, assim como no branco, a fim de comparar os efeitos provocados pela exposição ao tóxico. Na tabela 12 estão descritos os estágios observados nos animais expostos.

**Tabela 12** - Descrição dos estágios comportamentais do juvenil de tambaqui frente à exposição ao pesticida clorpirifós durante o Teste de Toxicidade Aguda (96 horas).

0.	Animal sem efeitos tóxicos, apresentando comportamentos normais ao seu padrão comportamental basal.
1.	À priori, o animal pode apresentar, alteração na respiração oro-branquial (acelerada, com movimentos operculares acelerados), e ainda, ocorrer aumento de sua motilidade para as zonas intermediária e superior, aparentando nado contínuo com movimentos rápidos e abruptos do corpo e das nadadeiras;
2.	O animal passa a apresentar nado estacionário com oscilação (agitação - “sacudidelas”) caudal e déficit de motilidade na coluna d’água, migrando temporariamente para a zona superior, permanecendo nesta zona por mais tempo. A partir desta etapa pode ser observada alteração na coloração da superfície corporal, com a presença de escurecimento;
3.	O animal pode apresentar perda de equilíbrio e respiração oro-branquial acelerada e, pode ser observada a protrusão labial. Além disso, podem ser percebidos giros e rodopios na superfície e/ou episódios oscilatórios (saltos) de alta excitabilidade, caracterizando-se como respostas de estresse respiratório. Existem casos de convulsão a partir desta fase;
4.	O animal pode apresentar nado errático persistente e respiração oro-branquial levemente acelerada. Pode ocorrer a perda súbita do padrão natatório, caracterizado pelos desacertos deste no seu deslocamento pela coluna d’água, com movimentos desorientados de nado. A partir desta fase pode haver ou não evidência de rubor por todo corpo, com mais intensidade na região opercular e abaixo da nadadeira dorsal, caracterizando-se como resposta inflamatória e/ou hemorragia muscular;
5.	O animal, pode demonstrar perda de equilíbrio e episódios curtos de paralisia (da musculatura axial), com poucos movimentos de suas nadadeiras pélvicas, peitorais mais respiração oro-branquial lenta, além de, períodos espasmódicos ou convulsões esporádicas (semelhante à fase clônica de uma crise convulsiva) com contorções corporais e deslocamentos pequenos de curta duração;
6.	O animal, apresenta rigidez do músculo – esquelético axial, podendo resultar em uma anormalidade corporal. Com isso, este demonstra respiração oro-branquial oscilante ( <i>i.e.</i> ao reduzir seus movimentos natatórios os batimentos oro-branquiais ficam acelerados, e não obstante, seus batimentos respiratórios ficam imperceptíveis); reduzidos movimentos de suas nadadeiras pélvicas e peitorais;
7.	É possível observar episódios prolongados de letargia e/ou paralisia do animal, onde, este fica em estado inerte e paira na coluna d’água, ficando condicionado a ser deslocado pelo fluxo do ambiente (aeração artificial), e por vezes, nota-se, o tombamento no fundo do aquário e manter-se nesta posição por períodos curtos ou prolongados, demonstrando batimento opercular muito acelerado;
8.	O animal pode evidenciar estágios letárgicos persistentes (paralisia corporal e manutenção dos movimentos operculares com uma frequência reduzida, e eventuais movimentos das nadadeiras peitorais) e aparenta alta hipersensibilidade à estímulos externos, pois, quando sofre perturbações alheias nada rapidamente em círculos;
9.	O animal pode apresentar uma crise convulsiva mais prolongada, onde, este aparenta paralisia seguido de contorções no corpo (semelhante à fase tônica da de uma crise convulsiva), podendo apresentar rodopios irregulares com nado rápido em círculos, e ainda pode ocorrer, simultaneamente, episódios espasmódicos e/ou tremores intensos, seguido de um deslocamento veloz, em um percurso sem orientação de nado (semelhante à fase clônica de uma crise convulsiva). Além disso, essas alterações podem vir seguidas, posteriormente, por uma letargia, onde as nadadeiras peitorais e o opérculo ficam estendidos involuntariamente para a posição mais anterior possível;
10.	O animal cessa os movimentos das nadadeiras peitorais mais os vestígios de respiração oro-branquial, e sua homeostase é encerrada, provocando sua morte.

Fonte: Autoral, 2018

O rápido levantamento sobre os parâmetros comportamentais observados nos grupos incluindo o branco (controle), permitiu estabelecer a relação entre concentração-resposta através de critérios como ocorrências de quantitativo de animais nas horas em que foram verificados. A tabela 13, ilustra as pontuações atribuídas aos *scores* seguindo o método de Nwani *et al.*, (2013).

**Tabela 13** - Manifestação dos efeitos (*scores*) comportamentais em 96h de exposição aguda ao clorpirifós no presente estudo.

Concentração (µg/L)	Batimento Opercular Acelerado	Nado Excitatório	Nado na Zona Superior	Respiração na Superfície	Perda de Equilíbrio Natatório	Nado Errático	Rigidez	Paralisia	Convulsão Tônica	Espasmos	Convulsão Clônica
<b>24h</b>											
0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,5	+	+	++	+	+	+	-	+	-	-	-
10	++	-	++	+	++	+	+	+	+	+	-
15	++	-	+	+	++	+	-	+	+	+	-
25	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
45	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-
<b>48h</b>											
0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,5	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	-
10	+	+	++	++	++	+	+	+	-	+	-
15	++	-	++	+	++	++	-	-	+	++	-
25	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>72h</b>											
0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,5	+	++	+	+	+	+	-	-	-	+	-
10	++	-	+	++	++	+	+	+	+	+	+
15	+	-	++	++	++	+	+	+	-	++	+
25	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-
45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>96h</b>											
0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,5	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	++	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
25	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Escala de pontuação dos efeitos em quantitativos de animais de cada concentração: - = Nenhum (0 animais); + = Leve (1-5 animais); ++ = Moderado (6-10 animais); +++ = Intenso (11-15 animais). **Fonte:** Autoral, 2018.



Os dados da tabela 13, sugerem que os animais demonstraram diversos distúrbios comportamentais diferentes do grupo controle (branco). A concentração de 45µg/L apresentou os efeitos de: batimento opercular acelerado, perda de equilíbrio natatório, rigidez muscular e convulsão tônica; e em 48h de exposição ocorreu a morte de todos os indivíduos, daí o fato de não aparecer nenhuma pontuação após este período. Enquanto que, as demais concentrações manifestaram efeitos que não foram percebidos na concentração maior, como: nado na zona superior, respiração na superfície, nado errático, rigidez muscular, paralisia, espasmos e convulsão clônica; e nem todos os indivíduos que apresentaram tais alterações morreram.

Segundo Eaton *et al.*, (2008) e Kopjar *et al.*, (2017), na intoxicação aguda, o clorpirifós possui ação toxicológica de 48 horas após a exposição inicial do organismo, podendo o indivíduo sofrer a ação tóxica, se desintoxicar (destoxificação), ou o composto volatilizar por este período e assim atenuar seus efeitos no ambiente. Teoricamente, pode-se dizer que ocorreu quaisquer destas hipóteses no decorrer do experimento, e podemos sugerir que em até 48h o produto tenha volatilizado. Pois, verificou-se que, a mortalidade na população de juvenis ocorreu dentro deste período (dois dias), e depois, o odor ficou amenizado no ambiente, e os efeitos aparentaram-se mais atenuados sobre o comportamento. Na pesquisa de Majumder e Kaviraj (2018), por exemplo, observaram-se picos de efeitos toxicológicos do clorpirifós entre 12 e 48h em tilápia, e após percebeu-se uma redução até 96h.

Em análise comparativa, as alterações comportamentais consideradas neste estudo estão concomitantes com outras pesquisas utilizando o clorpirifós. Como no trabalho de Woke e Aleleye-Wokoma (2009), que atribuíram efeitos como: inquietação, natação descoordenada, hemorragia na região do pedúnculo caudal e opercular, perda de equilíbrio, batimento opercular acelerado e engolimento do ar indicando estresse respiratório, em juvenis de *Clarias gariepinus* ao clorpirifós etil em 96h de exposição nas concentrações subletais: 0.5, 1.0, 2.0 e 4.0µg/L.

Adeyemo, Akintoye e Oghi (2004), relataram distúrbios em juvenis de *Clarias gariepinus* como: batimento opercular acelerado, movimentos irregulares e erráticos, nado contínuo, perda de equilíbrio, respiração na superfície, além de produção excessiva de muco, hemorragia aparente na região opercular, e convulsão tônica antes da morte. Assim também, o pesticida clorpirifós causou em juvenis de *Clarias gariepinus*, por 96h de exposição, efeitos de: natação errática e espasmódica, tentativa de pular para fora da água, engolimento de ar frequente na superfície, diminuição dos movimentos operatórios, e secreção de muco no corpo e brânquias, exaustão e morte (NWANI *et al.*, 2013).

Ademais, no trabalho desenvolvido por Ramesh e David (2009), o clorpirifós (20% EC) causou alterações comportamentais como: nado errático, hiper excitabilidade, perda de equilíbrio total, afundamento, e alteração morfológica na flexão caudal, em juvenis de *Cyprinus carpio*, sob exposição subletal nas concentrações 0.0224 e 0.0112mg/L. E na pesquisa executada por Paracampo *et al.*, (2014), observaram-se efeitos de: desequilíbrio natatório, estresse respiratório, afundamento e respiração na superfície, na espécie neotropical *Cnesterodon decemmaculatus* sob clorpirifós (97% de i. a.).

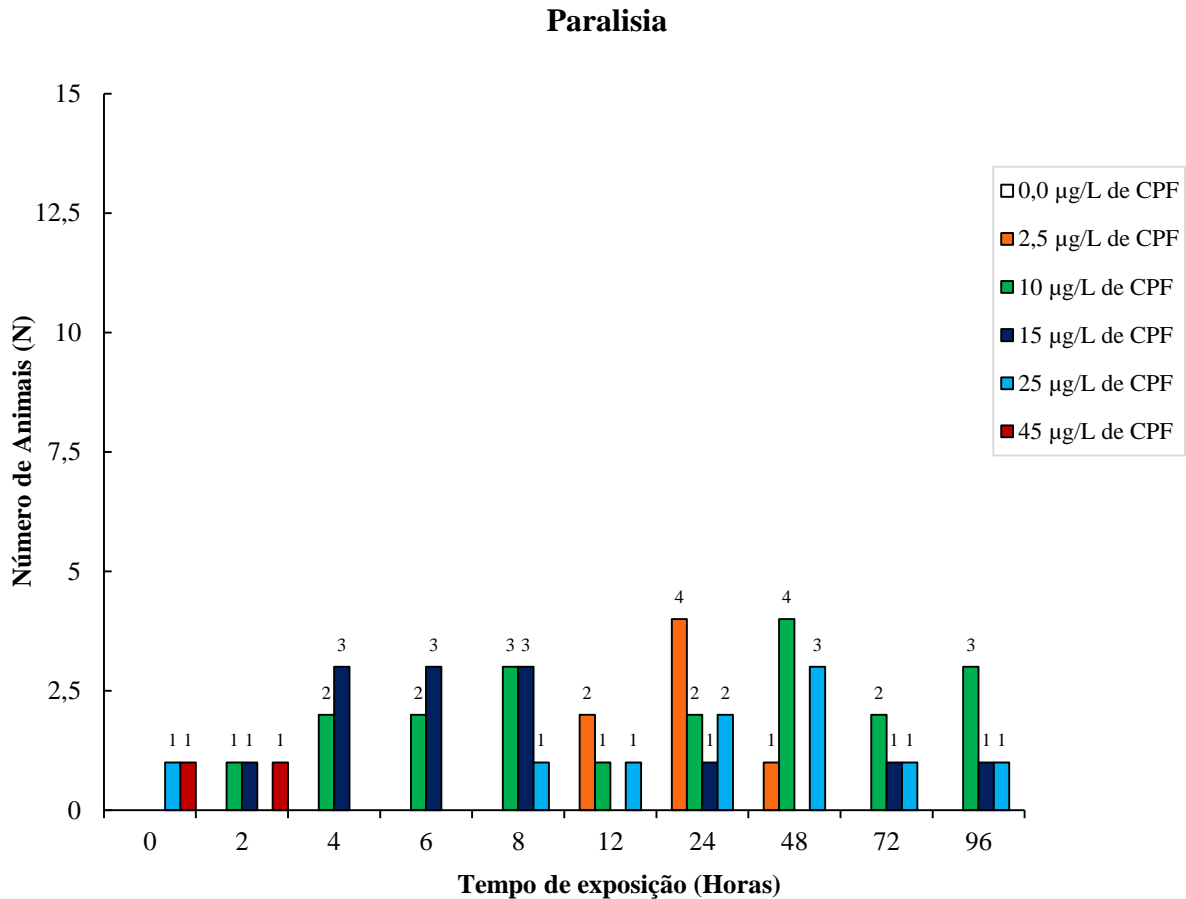
Por outro lado, outros estudos apontam efeitos comportamentais semelhantes em exposição de peixe para outros pesticidas. Moura (2009), reportou alterações sobre o comportamento de juvenis de tambaqui como: natação errática, nado e respiração na superfície, mudança na coloração, letargia, e formação de muco, em exposição ao herbicida glifosato. O herbicida trifluralina alterou o nado, e provocou também, paralisia opercular e letargia, em peixe tambaqui (SILVA, 2013). O herbicida atrazina provocou em juvenis de tambaqui, perda de equilíbrio, letargia, diminuição dos batimentos operculares, aumento da espessura dos lábios inferiores (CHAPADENSE *et al.*, 2009). O inseticida rotenona, de origem natural, aduziu alterações de comportamentos como: tremores, paralisia, perda de equilíbrio e natação errática em juvenis de *P. reticulata* (MELO *et al.*, 2015).

A ação intensa dos organofosforados sobre nervos e fibras musculares pode resultar em paralisia e morte nos animais (WALSH, LYNDON e JAMIESON, 2007). Segundo Aguiar *et al.*, (2004), os organofosforados alteram a função nervosa e causam danos fisiológicos em peixes. Por isso, a ação do clorpirifós sobre o comportamento pode ser associada principalmente aos impactos provocados pela inibição da acetilcolinesterase muscular e cerebral, visto que é o efeito primário previsto para este pesticida. Assim, dentre os comportamentos alterados pelo estressor químico (clorpirifós), destacam-se, a paralisia, espasmos e convulsão, relacionados à hiperestimulação colinérgicas que se assemelham aos sintomas de convulsão em zebrafish, abordados na literatura de Mussulini *et al.*, (2013).

A paralisia, identificada como resposta de imobilidade motora do indivíduo, possui relação ao estresse inibitório causado pela intoxicação aguda do pesticida clorpirifós (NAIME, 2017). Esta manifestação pode ser simultaneamente acompanhada de afundamento do animal, como foi observada em peixes da espécie *Clarias gariepinus* (ADEYEMO, AKINTOYE e OGGI, 2004; WOKE e ALELEYE-WOKOMA, 2009), carpa comum (RAMESH e DAVID, 2009), e *Cnesterodon decemmaculatus* (PARACAMPO *et al.*, 2014).

No gráfico da figura 12, é possível observar o quantitativo de juvenis que sofreram este dano comportamental pela exposição ao clorpirifós no presente estudo.

**Figura 12** - Gráfico representando o quantitativo de indivíduos expostos ao pesticida clorpirifós que manifestaram episódios rápidos de paralisia, demonstrando efeitos associados à exposição aguda até as 96 horas.



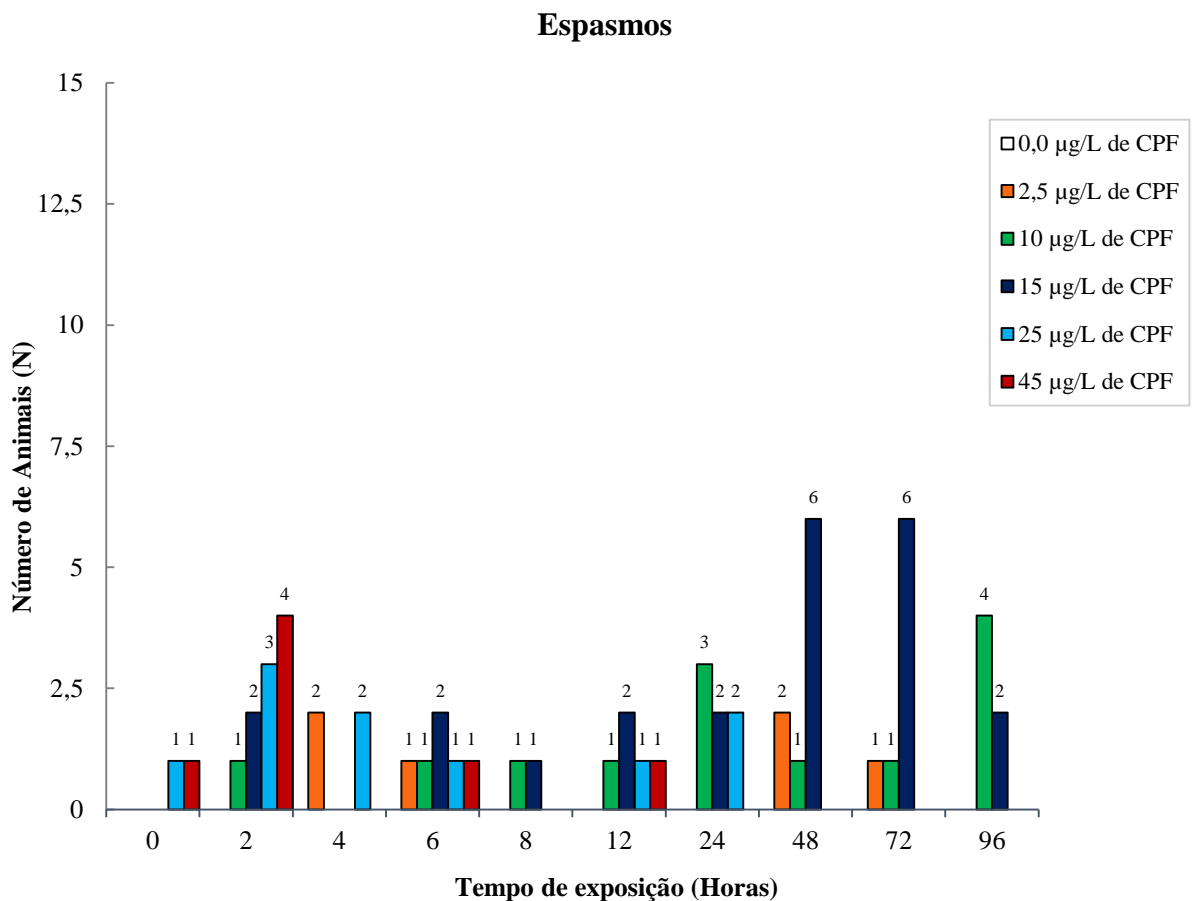
Dos animais expostos em 15 µg/L, 40% manifestaram episódios rápidos de paralisia; nas concentrações de 10 e 45µg/L, 26,6% dos indivíduos de cada uma destas concentrações também aparentaram manifestação. As concentrações intermediárias (10 e 15µg/L) aparentaram ter causado mais episódios de paralisia em 48 e 72 horas, ou seja, em tempos maiores de exposição. A mortalidade reduziu o número de organismos nas concentrações maiores, e isto pode ter influenciado após 24 horas menor quantitativo para esta resposta sob concentrações maiores.

Espasmos, é um dos efeitos associados com a intoxicação aguda do clorpirifós, caracterizado por contrações musculares involuntárias parciais ou generalizadas, como tremores e câibras (NAIME, 2017). De acordo com Venturini (2010), o triclorfon

(organofosforado) causou prováveis sintomas de efeitos excitatórios como espasmos musculares em pacu (*P. mesopotamicus*), e estes mesmos efeitos foram evidenciados em curimatá (*Prochilodus scrofa*) no estudo de Rodrigues *et al.*, (1997). Tal resposta também foi revelada em *Clarias gariepinus*, sob exposição de 96 horas ao clorpirifós, de acordo com Nwani *et al.*, (2013). Vale salientar, que a manifestação de comportamento similar foi caracterizada em zebrafish, como sintoma de crise epiléptica, segundo o estudo de Mussulini *et al.*, (2013), utilizando-se fármaco padrão para indução.

No gráfico da figura 13, é possível observar o quantitativo de juvenis que possivelmente sofreram este dano comportamental pela exposição ao clorpirifós neste estudo.

**Figura 13** - Gráfico representando o quantitativo de indivíduos expostos ao pesticida clorpirifós que manifestaram episódios rápidos de espasmos, demonstrando efeitos associados à exposição aguda até as 96 horas.

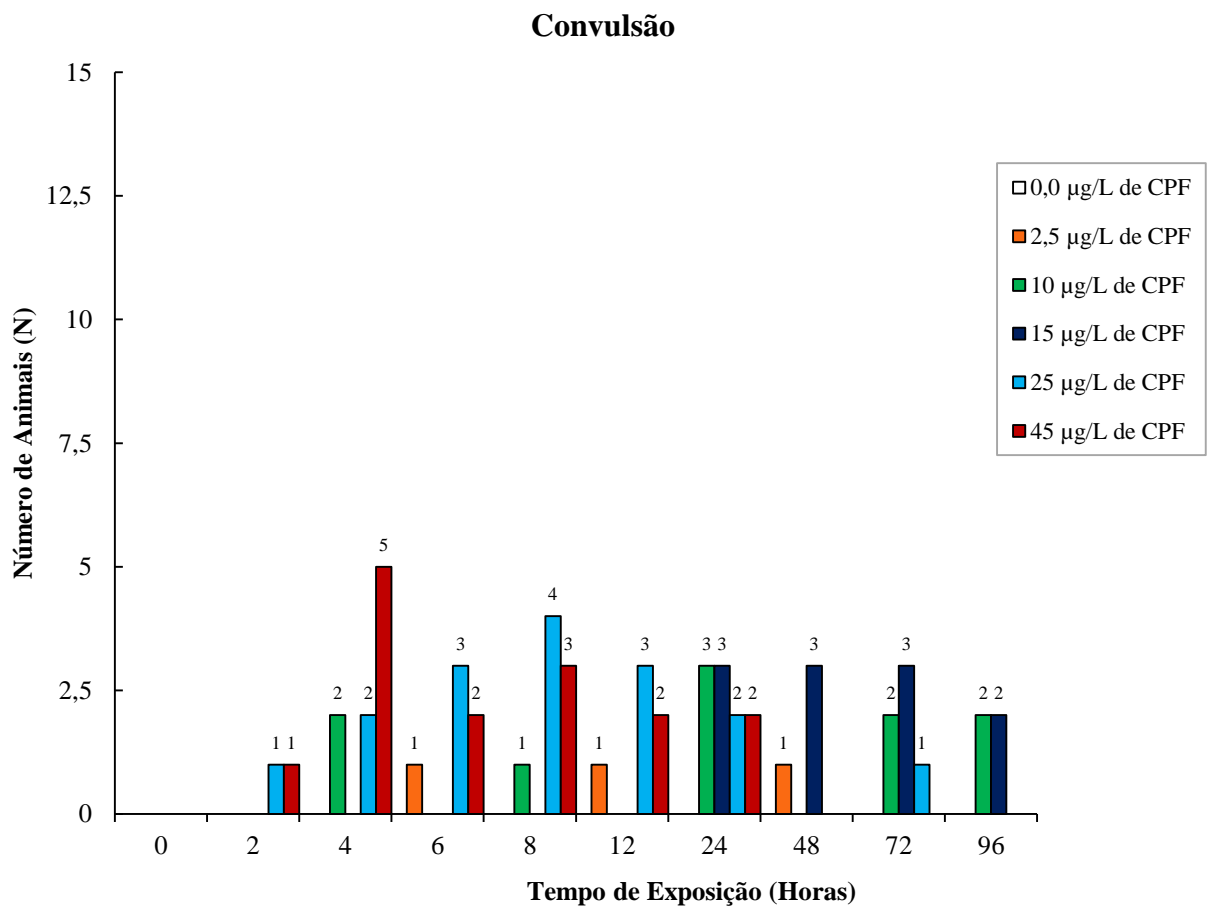


Dentre a população exposta, 40% dos animais presentes na concentração de 15µg/L tiveram este sintoma em 48 e 72h, e respectivamente 26,6% de indivíduos nas concentrações

de 10 e 45µg/L também aparentaram episódios. Após 24h, as concentrações menores aparentaram mais episódios deste sintoma em quantitativo de indivíduos. Aliás, a concentração intermediária (15µg/L), aparentou mais episódios quando se compara quantitativamente com os demais grupos em todas as horas.

A convulsão clônica é uma manifestação acompanhada de contrações musculares rápidas, anormais de corpo inteiro, semelhantes ao comportamento clônico convulsivo (DESMOND *et al.*, 2012; MUSSULINI *et al.*, 2013). Na convulsão tônica, ocorre o aumento do tônus muscular, em que os músculos se contraem e relaxam de modo rápido e descoordenado, acompanhado de enrijecimento e perda de consciência (DESMOND *et al.*, 2012; MUSSULINI *et al.*, 2013). Sugere-se, que foram observadas respostas de convulsão do tipo tônica ou clônica nos juvenis, conforme os dados na figura 14.

**Figura 14** - Gráfico representando o quantitativo de indivíduos expostos ao pesticida clorpirifós que manifestaram episódios de convulsão (do tipo tônica ou clônica), demonstrando efeitos associados à exposição aguda até as 96 horas.



Os dados sugerem que as concentrações mais altas (25 e 45µg/L) causaram episódios de convulsão do tipo clônica ou tônica em um maior quantitativo de indivíduos em 24h de exposição. A concentração de 45µg/L provocou convulsão em 33% em 4h de exposição, seguida da concentração de 25µg/L com 26,6% em 8h de exposição. Em contrapartida, a concentração intermediária (15µg/L) provocou em 20% dos indivíduos em 24, 48 e 72h, aparentando maior índice em relação aos outros grupos a partir de 24h de exposição.

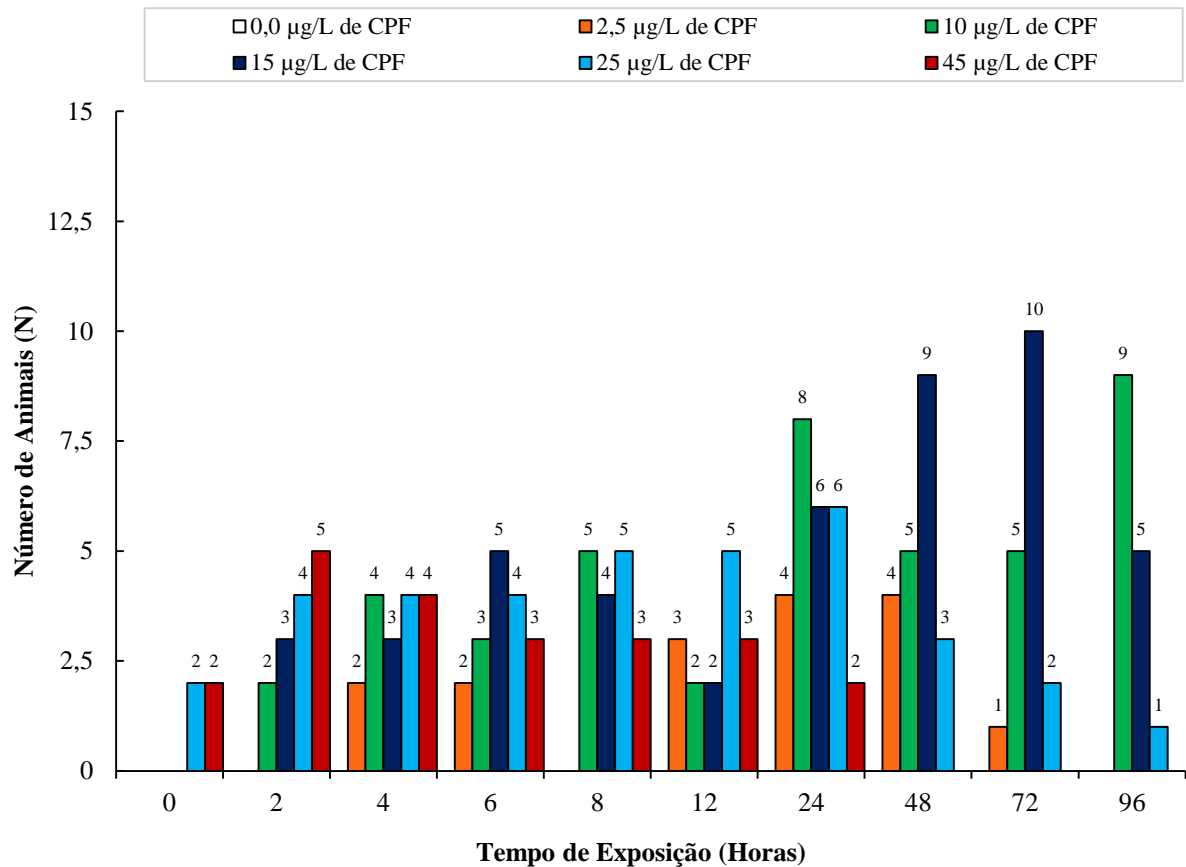
O clorpirifós provocou convulsão tônica, acompanhada de rigidez muscular, paralisia de nado e afundamento, em peixes da espécie *Clarias gariepinus* (TILAK, VEERAIHAH e RAO, 2004; ADEYEMO, AKINTOYE e OGHI, 2004; SLOTKIN, OLIVER e SEIDLER, 2005). Outrossim, SOTO-OTERO *et al.*, (1987), apontaram convulsão clônica em ratos, como resposta convulsiva relacionada a danos no sistema nervoso central. Baraban *et al.*, (2005), relataram a convulsão clônica em larvas do peixe zebrafish comparando-a com respostas similares à episódios epilépticos observados em roedores, e Mussulini *et al.*, (2013) verificaram tal efeito em zebrafish, induzindo crises epilépticas. Neste contexto, sugere-se que, possíveis efeitos de convulsão em peixes relacionados à exposição ao clorpirifós e/ou outros pesticidas organofosforados, necessitam de investigações, visto que, este sintoma é um dos prováveis efeitos neurotóxicos associados à epilepsia.

A latência para a manifestação desses efeitos (paralisia, espasmos e convulsão), pode ser compreendida como, o intervalo entre o contato inicial dos peixes com o tóxico e a percepção dos efeitos comportamentais em função do tempo de exposição. Foi considerada a somatória do quantitativo de indivíduos que manifestaram algum destes sintomas que, vale frisar, aparecem entre os estágios de nº 5 da tabela 8, como efeitos muito nocivos associados à exposição aguda.

Na figura 15, encontra-se a somatória do número de indivíduos que manifestaram estes efeitos pela exposição ao clorpirifós neste estudo.

**Figura 15** - Gráfico representando a soma do quantitativo de indivíduos que manifestaram em 96 horas de exposição pelo menos um dos episódios expostos nos estágios de nº 5 da tabela 8, indicando a latência para atingir os sintomas que se assemelham à convulsão. Os sintomas apresentados: paralisia, espasmos e convulsão (tônica ou clônica) estão associados ao tóxico que podem ser relacionados aos efeitos convulsivos em peixes.

**Tempo de latência para a manifestação de episódios: paralisia, espasmos, convulsão**



Aparentemente, as concentrações de 10 e 15µg/L foram as que mais causaram os efeitos avaliados. O quantitativo de animais afetados destas duas concentrações são representados por 60% e 66% em seus maiores índices, nos períodos de 24, 48, 72 e 96h. Enquanto que, as maiores concentrações (25 e 45µg/L) aparentaram redução no quantitativo de indivíduos afetados por algum destes sintomas.

Os juvenis, aparentaram estresse já nas primeiras horas de exposição, do mesmo modo que foram observados sinais de agitação em peixes da espécie carpa comum no contato inicial com diazinon (organofosforado) por Svobodova *et al.*, (2003), e também por Moura (2009) que relatou mudanças no comportamento de tilápia do Nilo, carpa comum e tambaqui, desde as

horas iniciais de exposição ao glifosato, assim como Nwani *et al.*, (2013) que notaram mudanças em *Clarias gariepinus*, desde os primeiros momentos expostos ao clorpirifós.

Percebeu-se que, os efeitos sobre o comportamento nos períodos iniciais, foram manifestados mais rapidamente quanto maior a concentração. Inclusive, na maior concentração (45µg/L), indivíduos afetados não manifestaram alguns comportamentos que foram percebidos nos outros grupos-teste. Assim, pode-se sugerir uma possível relação das respostas observadas com a concentração e o tempo de exposição. Concordando com Nwani *et al.*, (2013) e Majumder e Kaviraj (2018), que encontraram em seus estudos, uma relação de respostas fisiológicas e comportamentais com as concentrações do clorpirifós. Aonde, os peixes das maiores concentrações, sofreram efeitos severos mais rapidamente e morreram. Aliás, Majumder e Kaviraj (2018), verificaram essa relação sob as concentrações 12 e 25µg/L, ou seja, valores condizentes aos usados neste estudo.

Observou-se, que nas concentrações a partir de 25µg/L alguns animais do mesmo grupo apresentaram sintomas de intoxicação mas não morreram. Para Venturini (2010), a morte do organismo pela exposição à um tóxico está condicionada à sua capacidade intrínseca de tolerância ser extrapolada. E de acordo com Deb e Das (2013) e Souza (2014), existem diferenças de suscetibilidade (variáveis) entre os organismos que podem influenciar suas respostas aos tóxicos mesmo sendo um grupo e/ou amostra homogênea.

Wendelaar Bonga (2008), afirma que, as respostas intrínsecas aos estressores, envolvem ativações típicas à níveis cerebrais e hormonais, com possíveis aumento de atividades cardiorrespiratórias e do metabolismo energético. Barton (2002), salienta que, a fisiologia envolta do estresse, é primariamente, conhecida por alterar os níveis circulatórios de hormônios catecolaminas e corticosteroides; provocando, secundariamente, a homeostase, acarretando o desequilíbrio do fluxo iônico (hidromineral), além das funções imunológicas, cardíacas, respiratórias e circulatórias; e por fim, as respostas terciárias que afetam, por exemplo, o desenvolvimento, suscetibilidade e o comportamento.

Segundo Hontela *et al.*, (1993), os pesticidas de um modo geral, possuem a capacidade de alterar os níveis do hormônio cortisol; ou seja, induzir o estresse. Mataqueiro (2002), expõe que, os peixes quando submetidos ao estresse químico aumenta os níveis de cortisol na corrente sanguínea, conforme verificou em peixes da espécie *P. mesopotamicus* submetidos a testes toxicológicos com o pesticida parathion (organofosforado).



Respostas fisiológicas de estresse oxidativo é um dos eventuais sintomas apontado como perturbação associada às alterações no comportamento. Slaninova (2009), destaca que, os pesticidas comumente induzem estresse oxidativo em peixes. Segundo Naime (2017), o clorpirifós provocou estresse oxidativo em ratos, assim como Cunha *et al.*, (2018) e Kopjar *et al.*, (2017), também reportaram o mesmo sintoma em ratos expostos ao clorpirifós, corroborando com o estudo de Yaseen *et al.*, (2019), que verificaram tal sintoma em ratos submetidos a testes de toxicidade com os pesticidas: fipronil, malathion e o clorpirifós. Dentre outros autores, Mataqueiro (2002), Kavitha e Rao (2007), Oruç (2010), Sharbidre, Metkari e Patode (2011); Venturini *et al.*, (2014), e Majumder e Kaviraj (2018), afirmaram estresse oxidativo em peixes expostos a pesticidas organofosforados, incluindo o clorpirifós.

Além disso, as respostas comportamentais e morte dos juvenis pode indicar alterações fisiológicas como, a perda de equilíbrio homeostático. Pois, de acordo com Chrousos (1998) e Sancho *et al.*, (2009), o estresse se configura como o estágio aonde a homeostase do organismo encontra-se ameaçada; e que a sobrevivência do indivíduo depende de respostas intrínsecas adaptativas e complexas, sendo estas, um conjunto de respostas fisiológicas compensatórias à fatores e estressores extrínsecos (xenobióticos), incluindo reações corpóreas.

No presente estudo, a mortalidade e as alterações comportamentais foram importantes ferramentas utilizadas para análises de toxicidade aguda. Porém, é importante frisar, que a utilização de marcadores complementares como, análises histopatológicas, genotóxicas, e hematológicas para elucidar efeitos subletais possui grande relevância para avaliar efeitos morfológicos.

## **7 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O pesticida organofosforado clorpirifós demonstrou-se muito tóxico para juvenis de tabaqui, apresentando a  $CL_{50-96h}$  de 16.42µg/L. Foi possível verificar que, quando expostos à este produto, os peixes manifestaram alterações comportamentais de muita relevância, pois pode representar grande ameaça para a sobrevivência destes animais na natureza. Além de corroborar com outros estudos, os resultados apontam para a necessidade de maiores investigações ecotoxicológicas para pesticidas sobre ictiofaunas da Amazônia.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-HALIM, K. Y.; SALAMA A. K.; EL-KHATEEB, E. N.; BAKRY, N. M. Organophosphorus pollutants (OPP) in aquatic environment at Damietta Governorate, Egypt: implications for monitoring and biomarker responses. **Chemosphere**, v. 63, p. 1491-1498, 2006.
- ABHILASH, P. C.; SINGH, Nandita. Pesticide use and application: an Indian scenario. **J. Hazard. Mater**, v. 165, p. 1-12, 2009.
- ADEYEMO, O. K.; AKINTOYE, O. A.; OGI, M. L. Acute toxicity of chlorpyrifos (Dursban®) to *Clarias gariepinus* juveniles. **Trop. Vet.**, v. 22, n.1, p. 7-11, 2004.
- AGUIAR, L. H.; MORAES, L.; AVILEZ, I. M.; ALTRAN, A. E.; CORRÊA, C. F. Metabolical effects of Folidol 600 on the neotropical freshwater fish matrinxã, *Brycon cephalus*, **Environ. Res.**, v. 95, p. 224-230, 2004.
- ALI, D.; NAGPURE, N. S.; KUMAR, S.; KUMAR, R.; KUSHWAHA, B.; LAKRA, W. S. Assessment of genotoxic and mutagenic effects of chlorpyrifos in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single cell gel electrophoresis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 3, p. 650-656, 2009.
- AMORIM, João Antônio Silva. **Avaliação do espectro de reação de um sistema de diagnóstico por vídeo rastreio de peixes zebra (*Danio rerio*) expostos a cinco tóxicos distintos**, 2014, 79 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar e Toxicologia e Contaminação Ambientais, Universidade do Porto, Portugal, 2014.
- ARANHA, Rúbia Conceição. **Potencial de Toxicidade dos Herbicidas Glifosato e Imazetapir em *Colossoma macropomum* (Pisces)**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Recursos Naturais da Amazônia, Universidade Federal do Oeste do Pará, 2011.
- ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M.; GOMES, L. C. Tambaqui (*Colossoma macropomum*) In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM, p. 67-104, 2005.
- ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M.; GOULDING, M. **Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia**. São Paulo: Lithera Maciel Editora Gráfica, 1998. vol. 4, 186 p.
- ARIDE, P. H. R.; ROUBACH, R.; VAL, L. A. Tolerance response of tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier) to water pH. **Aquaculture Research**, v. 38, p. 588-594, 2007.
- ASSIS, Caio Rodrigo Dias de. **Caracterização de acetilcolinesterase do tambaqui (*Colossoma macropomum*) e efeitos de pesticidas Organofosforados e Carbamatos sobre sua atividade**, 2008, 63 f. Dissertação (Mestrado) – Curso em Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2008.
- ASSIS, C. R. D.; CASTRO, P. F.; AMARAL, I. P. G.; CARVALHO, E. V. M. M.; CARVALHO JUNIOR, L. B.; BEZERRA, R. S. Characterization of acetylcholinesterase from the brain of the Amazonian tambaqui (*Colossoma macropomum*) and *in vitro* effect of Organophosphorus and carbamate pesticides. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 10, p. 2243–2248, 2010.

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT), NBR 15088:04. **Ecotoxicologia aquática** – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes, 2004, p. 19.
- ARTUZO, F. D.; FOGUESATTO, C. R.; SOUZA, A. R. L.; SILVA, L. X. Gestão de custos na produção de milho e soja. **Rev. Bras. Gest. Neg. São Paulo**, v. 20, n. 2, p. 273-294, 2018.
- BRABO, M. F.; PEREIRA, L. F. S.; FERREIRA, L. A.; COSTA, J. W. P.; CAMPELO, D. A. V.; VERAS, G. C. A cadeia produtiva da aquicultura no nordeste paraense, Amazônia, Brasil. **Informações Econômicas, São Paulo**, v. 46, n. 4, 2016.
- BHATNAGAR, A.; YADAV, A. S; CHEEMA, N. Genotoxic effects of chlorpyrifos in freshwater fish *Cirrhinus mrigala* using micronucleus assay. **Advances in Biology**, v. 2016, p. 1-6, 2016.
- BAIRD, D. J.; BRINK, P. J. Usando características biológicas para prever a sensibilidade das espécies a substâncias tóxicas. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 67, p. 296-301, 2007.
- BALDISSEROTO, Bernardo. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Edição 2, Santa Maria: UFSM, 212 p., 2002.
- BARABAN, S. C; TAYLOR, M. R; CASTRO, P. A; BAIER H. Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. **Neuroscience**, v. 13, p. 759-768, 2005.
- BARTHEM, Ronaldo Borges; FABRÉ, Nidia Noemi. Biologia e diversidade dos recursos pesqueiros da Amazônia, 2002, 268 p. In: (Ed.). **A pesca e os recursos pesqueiros na Amazônia brasileira**. Ibama/Pro várzea, Manaus, Brasil, p. 17-62, 2002.
- BARTON, Bruce A. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integ. And Comp. Biol.**, v. 42, p. 517-525, 2002.
- BAYLEY, Peter B. Fish yield from the Amazon in Brazil: comparison with African river yields and management possibilities. **Trans. Am. Fish. Soc.**, v. 110, p. 351-359, 1981.
- BEDNARSKA, A. J.; CHOCZYŃSKI, H.; LASKOWSKI, R.; WALCZAK, H. Combined effects of chlorpyrifos, copper and temperature on acetylcholinesterase activity and toxicokinetics of the chemicals in the earthworm *Eisenia fetida*. **Environmental Pollution**, v. 2016, p. 1-10, 2016.
- BELDEN, Jason B.; LYDY, Michael J. Joint toxicity of chlorpyrifos and esfenvalerate to fathead minnows and midge larvae. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.25 n.2, p. 623-629, 2006.
- BERTOLETTI, Eduardo. Sensibilidade de algumas espécies de peixes de água doce utilizadas no Brasil. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.** v. 4, n. 1-3, p. 9-13, 2009.
- BOONE Scott J.; CHAMBERS, Janice. E. Time course of inhibition of cholinesterase and aliesterase activities, and nonprotein sulfhydryl levels following exposure to organophosphorus insecticides in mosquitofish (*Gambusia affinis*). **Fund. Appl. Toxicol.**, v. 29, p. 202–207, 1996.
- BRASIL. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SAÚDE COLETIVA (ABRASCO). **Dossiê ABRASCO: Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. (Org.) CARNEIRO, *et al.* Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, p. 624, 2015.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. **Agrotóxicos na ótica do Sistema Único de Saúde**. – Brasília: Ministério da Saúde, v. 2, 2016.

BRASIL. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA ESTATÍSTICA( IBGE). **Produção Agrícola Municipal, 2016**: culturas temporárias e permanentes. Rio de Janeiro: IBGE 2017, v. 43, 2016. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pa/pesquisa/14/10193>>. Acesso em: 02/10/2018.

BUIKEMA, A. L.; VOSHELL, J. R. Toxicity studies using freshwater benthic macroinvertebrates. ROSENBERG, D. M.; RESH, V. H. *In: Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates*. New York: Chapman e Hall. p. 344-398, 1993.

CARDOSO, G. C. **Aspectos da produção da soja no estado do Pará**. Instituto de Estudos Superiores da Amazônia. 16 p., 2006.

CANNAVAN, Marina Camargo. Determinação da sensibilidade de *Poecilia reticulata* para o dicromato de potássio através de testes de toxicidade. **Rev. Elet. Biol.** v. 2, n. 4, p. 13-25, 2009.

CARLSON, R. W.; BRADBURY, S. P.; DRUMMOND, R. A.; HAMMERMEISTER, D. E. Neurological effects on startle response and escape from predation by medaka exposed to organic chemicals. **Aquat. Toxicol.** v. 43, p. 51-68, 1998.

CUNHA, Sara Cristina da Silva. **Segurança e autenticidade de azeitonas e azeites varietais**. Disponível em: <<http://repositorio-aberto.up.pt/handle/10216/21258>>. Acesso em: 15 de Junho, 2018.

CALISTO, M.; GOULART, M.; MEDEIROS, A. O.; MORENO, P.; ROSA, C. A. Diversity assessment of benthic macroinvertebrates, yeasts and microbiological indicators along a longitudinal gradient in Serra do Cipó, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 61, n. 2, p. 259-266, 2004.

CASANOVA, Frida Mesel. **Caracterização *in silico* de biossensores em *Colossoma macropomum*: diagnostico molecular e monitoramento de ambientes impactados**. 2008, 121 f. Dissertação (Mestrado) – Curso em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva. Instituto de Pesquisas da Amazônia, 2008.

CASSAL, V. B.; AZEVEDO, L. F.; FERREIRA, R. P.; SILVA, D. G.; SIMÃO, R. S. Agrotóxicos: uma revisão de suas consequências para a saúde pública. **REGET**, v. 18, n. 1, p. 437-445, 2014.

CARVALHO, E. V. M. M.; BEZERRA, R. F.; ASSIS, C. R. D.; BEZERRA, R. S.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. **Physiological and Biotechnological Approaches of the Amazonian tambaqui fish (*Colossoma macropomum*)**. In: Marine Biology, (Ed.) Nova Publishers, New York, p. 1-59, 2014.

CAVALCANTI, L. P. A. N.; AGUIAR, A. P.; LIMA, J. A.; LIMA, A. L. S. Intoxicação por Organofosforados: Tratamento e metodologias analíticas empregadas na avaliação da reativação e inibição da acetilcolinesterase. **Rev. Virt. Quim.** v. 8, n. 3, p. 739-766, 2016.

CHANDRASEKARA, Hiruni Udara; PATHIRATNE, Asoka. Influence of low concentrations of Trichlorfon on haematological parameters and brain acetylcholinesterase activity in common carp, *Cyprinus carpio*. L. **Aquac. Res.**, v. 36, n. 2, p. 144-149, 2005.

- CHAPADENSE, P. F. G.; CASTRO, F. J.; ALMEIDA, J. A.; MORON, S. E. Toxicidade do herbicida atrazina em *Colossoma macropomum*. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v. 10, n. 2, p. 398-405, 2009.
- CHAWANRAT, S.; CHEEVAPORN, V; CHUTARAT, S.; WILLIAM, F. H. B. Variability in acetylcholinesterase upon exposure to chlorpyrifos and carbaryl in hybrid catfish. **Science Asia**, v. 33, p. 301-305, 2007.
- CHEN, W. Q; ZHANG, Y. Z; YUAN, L; LI, Y. F; LI, J. Neurobehavioral evaluation of adolescent male rats following repeated exposure to chlorpyrifos. **Neurosci. Lett.**, v. 570, p. 76-80, 2014.
- CHOWDHARY, S; BHATTACHARYYA, R; BANERJEE, D. Acute organophosphorus poisoning. **Clínica Chimica Acta**, v. 431, p. 66-76, 2014.
- CHROUSOS, George P. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptative response. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 851, p. 311-335, 1998.
- COSTA, R. B. C; REBELO, J. P. A; GONÇALVES, J. S; COSTA, J. J. Intoxicações agudas por compostos organofosforados. **Acta Médica Portuguesa**, v. 1, n. 4-6, p. 291-295, 1988.
- CUNHA, Alexandre Frinhani. **Avaliação dos efeitos tóxicos da exposição ao inseticida clorpirifós sobre as respostas cardiovasculares e comportamentais em animais experimentais**. 2014, 99 f. Dissertação (Mestrado) Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2014.
- CUNHA, A. F; FELIPPE, I; FERREIRA-JUNIOR, N. C; RESSTEL, L. B. M; GUIMARÃES, D. A. M; BEIJAMINI, V; PATON, J. F. R; SAMPAIO, K. N. Neuroreflex control of cardiovascular function is impaired after acute poisoning with chlorpyrifos, an organophosphorus insecticide: possible short and long-term clinical implications. **Toxicology**, v. 398, n. 399, p. 13-22, 2018.
- DA CRUZ, C.; CUBO, P.; GOMES, G. R.; VENTURINI, F. P.; GUILHERME, P. E.; PITELLI, R. A. Sensibilidade de Peixes Neotropicais ao Dicromato de Potássio. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v. 3, n. 1, p. 53-55, 2008,
- DEB, Nobonita.; DAS, Suchismita. Chlorpyrifos Toxicity in Fish: A Review. **Current. World Environment**. v. 8, n. 1, p. 77-84, 2013.
- DE DEUS, Rafael Mattos; BAKONYI, Sônia Maria Cipriano. O impacto da agricultura sobre o meio ambiente. **REGET**, v. 7, n. 7, p. 1306-1315, 2012.
- DENG, Y.; ZHANG, Y., LU, Y., ZHAO, Y., REN, H. Hepatotoxicity and nephrotoxicity induced by the chlorpyrifos and chlorpyrifos-methyl metabolite, 3,5,6-trichloro-2-pyridinol, in orally exposed mice, **Sci. Total Environ.**, v. 2016, n. 544, p. 507-514, 2016.
- DEO, Lúcio Luiz. Anatomia e Fisiologia de Peixes Nativos. (Ed.) Capacitação Continuada na Cadeia Produtiva da Piscicultura em Mato Grosso – (EMBRAPA: Módulo de nivelamento da 3ª Turma de Zootecnia), **Aquicultura, Meio Ambiente e Sustentabilidade**, 2014.
- DE SILVA, P.; SAMAYAWARDHENA, L. Effects of chlorpyrifos on reproductive performances of guppy (*Poecilia reticulata*). **Chemosphere**, v. 58, p. 1293-1299, 2005.
- DESMOND, D.; KYZAR, E.; GAIKWAD, S.; GREEN, J.; RIEHL, R.; ROTH, A.; STEWART, A. M. Assessing Epilepsy-Related Behavioral Phenotypes in Adult Zebrafish. In:

KALUEFF, A; STEWART, A. (Ed.) **Zebrafish Protocols for Neurobehavioral Research**. Neuromethods, v. 66, Humana Press, Totowa, NJ, 2012.

EATON, D. L.; DAROFF, R. B; AUTRUP, H; PONTES, J; BUFFLER, P; COSTA, L. G; COYLE, J; MCKHANN, G; MOBLEY, W. C; NADEL, L; NEUBERT, D; SCHULTE-HERMANN R; SPENCER, P. S. Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 38, p. 1-125, 2008.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). **Conclusion on the peer review of the pesticide human health risk assessment of the active substance chlorpyrifos**. EFSA Journal. v. 12, n. 4, p. 3640, 2014, 34p.

FAUCHER, K; FICHET, D.; MIRAMAND, P; LAGARDÈRE, J. P. Impact of chronic cadmium exposure at environmental dose on escape behaviour in sea bass (*Dicentrarchus labrax*; Teleostei, Moronidae). **Environmental Pollution**, v. 151, p. 148-157, 2008.

FELIPPE, Igor Simões Assunção. **Avaliação *in vitro* e *in vivo* dos efeitos da intoxicação aguda com o inseticida organofosforado, clorpirifós, e da eficácia do tratamento farmacológico empregado na intoxicação sobre a modulação cardiorrespiratória tônica e reflexa**, 2017, 158 f. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, 2017.

FLEEGER, J. W; CARMAN, K. R; NISBET, R. M. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. **Science of the Total Environment**., v. 317, n. 1-3, p. 207-233, 2003.

FERRANDO, M. D; SANCHO, E; ANDREU-MOLINER, E. Comparative acute toxicities of selected pesticides to *Anguilla anguilla*. **Journal Environ Sci. Health, Part B**, v. 26, p. 491-498, 1991.

FERREIRA Cláudia Maris. Testes de toxicidade aquática para monitoramento ambiental. **Biológico**, v. 65, n. 1-2, p. 17-18, 2003.

FRECHES, Ana Raquel Gonçalves. **Efeitos ecológicos de substâncias químicas: uma nova perspectiva sobre velhas ferramentas**, 2015, 50 f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Ecologia, Ambiente e Território, Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, 2015.

GIL, Antônio Carlos. **Como elaborar projetos de pesquisa**. Ed. 4. São Paulo: Atlas, 2009.

GROFF, A. A; DA SILVA, J; NUNES, E. A; IANISTCKI, M; GUECHEVA, T. N; DE OLIVEIRA, A. M; DE OLIVEIRA, C. P; VAL, A. L; HENRIQUES, J. A. GROFF *et al.* UVA/UVB-induced genotoxicity and lesion repair in *Collossoma macropomum* and *Arapaima gigas* Amazonian fish. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 99, n. 2, p. 93-99, 2010.

GUEVARA, J. Ladrón de; PUEYO, V. Moya. **Toxicología médica: clínica y laboral**. (Ed.) Madrid: Interamericana, Mc Graw-Hill, 1995.

GÜL Ali. Investigation of acute toxicity of chlorpyrifos-methyl on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) larvae. **Chemosphere**, v. 59, p. 163–166, 2005.

GUNNARSSON, Jonas S.; CASTILLO, Luisa E. Ecotoxicology in tropical regions. **Environmental Science and Pollution Research**. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-018-1887-4>>. Editorial, p. 1-4, 2018

GUPTA, Ramesh C. (Ed.). **Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds**. Edição 1. United States of America: Academic Press, 2006.

RAMESH, Halappa; DAVID, M. Behavioural responses of the freshwater fish, *Cyprinus carpio* (Linnaeus) following sub-lethal exposure to chlorpyrifos. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 9, p. 233-238, 2009.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science Technology Iowa**, v. 7, p. 714-719, 1977.

HAVILAND, J. A.; BUTZ, D. E.; PORTER, W. P. Long-term sex selective hormonal and behavior alterations in mice exposed to low doses of chlorpyrifos in utero. **Reproductive Toxicology**, v. 29, n. 1, p. 74-79, 2010.

HAZARIKA, Ranjit. Neurotoxic impact of organophosphate pesticide phosphomedon on the albino rat. **Journal of Environmental Biology**, v. 35, n. 2, p. 427-430, 2013.

HELLAWELL, Jhon. M. Toxic substances in river and streams. **Environ. Pollut.**, v. 50, p. 61-85, 1988.

HELLOU, Jocelyne. Behavioural ecotoxicology, an "early warning" signal to assess environmental quality. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 18, p. 1-11, 2011.

HENRIQUES, Paulo Jorge Chaves dos Santos. **Estudo da eco etologia de *Diplodus vulgaris* (PISCES: SPARIDAE) – Padrões agonísticos e estruturação social**. 1997, 53 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Etologia, Instituto Superior de Psicologia Aplicada, Lisboa, 1997.

HODGSON, Ernest. **Biotransformation of individual pesticides: some examples**. Chapter 9, p.195-207. North Carolina State University, Raleigh, NC, United States American, 2012.

HONTELA, A.; RASMUSSEN, J. B.; AUDET, C.; CHEVALIER, G. Impaired cortisol stress response in fish from environments polluted by PAHs, PCBs and mercury. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 14, p. 725-731, 1993.

IGUSHI, Érica Yuri. **Alterações comportamentais em *Geophagus brasiliensis* submetidos à ação do herbicida glifosato**. 2012, 22 f. Monografia (Bacharelado) – Curso de Ciências Biológicas, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Posicionamento do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva Acerca dos agrotóxicos, 2015**. In: Ministério da Saúde, 2016. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 25/05/2017.

ISMIÑO-ORBE, R. A.; ARAUJO-LIMA, C. A. R. M.; GOMES, L. C. Excreção de amônia por tambaqui (*Colossoma macropomum*) de acordo com variações na temperatura da água e massa do peixe. **Pesq. Agropec. Bras, Brasília**, v. 38, n. 10, p. 1243-1247, 2003.

JARVINEN, Alfred W; TANNER, Danny K. Toxicity of selected controlled release and corresponding unformulated technical grade pesticides to the fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Environ. Pollut.**, v. 27, p. 179-195, 1982.

JONES, C. K.; BYUN, N.; BUBSER, M. Muscarinic and Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonists and Allosteric Modulators for the Treatment of Schizophrenia. **Neuropsychopharmacology reviews**, v. 37, p. 16-42, 2012.

JOSHI, S. C.; MATHUR, R; GULATI, N. Testicular toxicity of chlorpyrifos (an organophosphate pesticide) in albino rat. **Toxicology and Industrial Health**, v. 23, n. 7, p. 439-44, 2007.

JUNK, W. J. As águas da Região Amazônica. *In*: SALATI, E.; SCHUBART, H. O. R., JUNK, W. J. E; OLIVEIRA, A. E. (Ed.). **Amazônia: desenvolvimento, integração e ecologia**. CNPq/Brasiliense, São Paulo, p. 41-100, 1983.

KHATUN; TAIBUR, R.; MAHANTA, R.; NAZIA. Histopathological Studies of Chlorpyrifos Toxicity in Catfish. **Global Journal of Medical Research: C Microbiology and Pathology**. v. 16, n. 3, p. 50-54, 2016.

KAVITHA, P.; RAO, J. Venkateswara. Oxidative stress and locomotor behavior response as biomarker for assessing recovery status of mosquito fish, *Gambusia affinis* after lethal effects of an organophosphate insecticide, monocrotophos. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 87, p. 182-188, 2007.

KAVITHA, P.; RAO J. Venkateswara. Toxic effects of chlorpyrifos on antioxidant enzymes and target enzyme acetylcholinesterase interaction in mosquito fish, *Gambusia affinis*. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 26, p. 192–198, 2008.

KIENLE C.; KÖHLER, R. H.; GERHARDT, U. Behavioural and developmental toxicity of chlorpyrifos and nickel chloride to zebra fish (*Danio rerio*) embryos and larvae. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 72, p. 1740-1747, 2009.

KING, Andrew M.; AARON, Cynthia K. Organophosphate and Carbamate Poisoning. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 33, p. 133-151, 2015.

KOCHHANN, D.; DE AZEVEDO, B. S. M; DOMINGOS, F. X; VAL, A. Linking hematological, biochemical, genotoxic, and behavioral responses to crude oil in the amazon fish *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816). **Arch of Environmental Contam. and Toxic.**, v. 65, n. 2, p. 266-275, 2013.

KOPJAR, N.; ZUNEC, S.; MENDAS, G.; MICEK, V.; KASUBA, V.; MIKOLIC, A.; LOVAKOVIĆ, B. T.; MILIC, M.; PAVICIC, I.; CERMAK, A. M. M.; PIZENT, A.; LUCIC, VRDOLJAK, A.; JEELJEZIC, D. Evaluation of chlorpyrifos toxicity through a 28-day study: cholinesterase activity, oxidative stress responses, parent compound/metabolite levels, and primary DNA damage in blood and brain tissue of adult male Wistar rats. **Chem. Biol. Interact.**, v. 279, p. 51-63. 2017.

KUBTIZA, Fernando. Coletânea de informações aplicadas ao cultivo do tambaqui, do pacu e de outros peixes redondos. **Panorama da Aquicultura**, v. 14, p. 27-39, 2004.

KUNJAMMA, A. K. P.; PHILIP, B.; BHANU, S. V.; JOSE, J. Histopathological effects on *Oreochromis mossambicus* (tilapia) exposed to chlorpyrifos. **Journal of Environ Res and Dev**. v. 2, n. 4, p. 553-559, 2008.

KWONG, Tai C. Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. **Ther. Drug. Monit.**, v. 24, p. 144-149, 2002.



- LEVIN, E. D.; SWAIN, H. A.; DONERLY, S.; LINNEY, E. Developmental chlorpyrifos effects on hatchling zebrafish swimming behaviour. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 26, p. 719-723. 2004.
- LI, X.; LIU, G.; ZHANG, Y.; FANG, Q.; LI, Y.; LI, Y. Toxic effects of chlorpyrifos on lysozyme activities, the contents of complement C3 and IgM, and IgM and complement C3 expressions in common carp (*Cyprinus carpio*, L.). **Chemosphere**, v. 93, p. 428-433, 2013.
- LIMA, Charlyan de Sousa. **Proteína bruta em rações para alevinos de tambaqui e sua redução com suplementação de aminoácidos**. 2013, 71 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Maranhão, 2013.
- LIMA, K. F.; ALMEIDA, I. C.; TEIXEIRA, J. A.; MELO, R. A. A comercialização do pescado no município de Santarém, Pará. **Rev. Bras. Eng. Pesca**, v. 9, n. 2, p. 1-9, 2016.
- LINHARES, Amanda Guedes. **Efeito de pesticidas organofosforados e carbamatos sobre a acetilcolinesterase eritrocitária humana e seu potencial uso como biomarcador da exposição ocupacional**, 2014, 81 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 2014.
- LITTLE, E. E.; ARCHESKI, R. D.; FLEROV, B. A.; KOZLOVSKAYA, V. I. Behavioral indicators of sublethal toxicity in rainbow trout. **Arch. of Environ. Contam. and Toxic.**, v. 19, p. 380-385, 1990.
- LOMBARDI, J. V. Fundamentos de Toxicologia Aquática. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R. M.; LIZAMA, M. A. P. **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Varela, p. 263-272, 2004.
- LOUREIRO, C.; CASTRO, B. B; PEREIRA, J. L; GONÇALVES, F. Performance of standard media in toxicological assessments with *Daphnia magna*: chelators and ionic composition versus metal toxicity. **Ecotoxicology**, v. 20, p. 139-148, 2011.
- LUIZ PIRES, Nayara. **Expansão da Fronteira Agrícola e presença de glifosato e AMPA em amostras de água da região de Santarém (PA): Desafios Analíticos para o monitoramento ambiental**, 112 f, 2015. Dissertação (Mestrado) – Curso em Meio Ambiente e Desenvolvimento Rural, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.
- MAGALHÃES, Danielly de Paiva; FERRÃO FILHO, Aloisio da Silva. A Ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **O ecol. Bras.**, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.
- MAHARAJAN, A.; NARAYANASAMY, Y.; GANAPIRIYA, V. Histological alterations of a combination of Chlorpyrifos and Cypermethrin (Nurocombi) insecticide in the fresh water crab, *Paratelphusa jacquemontii* (Rathbun). **The Journal of Basic e Applied Zoology**, v. 72, p. 104-112, 2015.
- MAJUMDER, Rajib; KAVIRAJ, Anilava. Acute and sublethal effects of organophosphate insecticide chlorpyrifos on freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 2018, p. 1-9, 2018.
- MARTINEZ, C. B. R; CÓLUS, I. M. S. Biomarcadores em peixes neotropicais para monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, Moacyr E.; BIANCHINI, Edmilson; SHIBATTA, Oscar A.; PIMENTA, José A. **A bacia do Rio Tibagi**. Londrina: MC Gráfica, p. 551-577, 2002.

- MATAQUEIRO, Maria Isabel. **Toxicidade aguda e subaguda do inseticida methyl parathion no pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887)**, 2002, 47 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Centro de Aquicultura da UNESP, Universidade Estadual Paulista, 2002.
- MELO, K. M.; OLIVEIRA, R.; GRISOLIA, C. K.; DOMINGUES, I.; PIECZARKA, J. C.; SOUZA FILHO, J.; NAGAMACHI, C.Y. Short-term exposure to low doses of rotenone induces developmental, biochemical, behavioral, and histological changes in fish. **Environ. Sci. Pollut. Res. Int.**, v. 22, n. 18, p. 13926-13938, 2015.
- MENDONÇA, P. P.; FERREIRA, R. A.; VIDAL JUNIOR, M. V.; ANDRADE, D. R.; SANTOS, M. V. B.; FERREIRA, A. V.; REZENDE, E. F. P. Influência do fotoperíodo no desenvolvimento de juvenis de Tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Arch. de Zootecnia**, v. 58, p. 323-331, 2009.
- MENEZES, Ana Cristina Leite. **Toxicidade de cobre sobre tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) em pH 4 e pH 8**. 2005, 81 f. Dissertação (Mestrado) – Curso em Biologia de água doce e pesca interior. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, 2005.
- MEYER, Armando. **Pode a exposição humana ao inseticida clorpirifós alterar o Desenvolvimento do Sistema Nervoso Central? Contribuições de Experimentos em Animais**, 2005, 155 f. Tese (Doutorado) – Curso em Saúde Pública, Escola Nacional de Saúde Pública – FIOCRUZ, 2005.
- MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation research**, v. 399, n. 2, p. 135-47, 1998.
- MONTIGLIO, P., ROYAUTE, R. Contaminants as a neglected source of behavioural variation. **Animal Behaviour**, v. 88, p. 29-35, 2014.
- MORAGAS, Washington Mendonça; SCHNEIDER, Marilena de Oliveira. Biocidas: suas propriedades e seu histórico no Brasil. **Caminhos de Geografia**, v. 3, n. 10, p. 26-40, 2003.
- MOREIRA, R. A.; MANSANO, A. S.; DA SILVA, L. C.; ROCHA, O. A comparative study of the acute toxicity of the herbicide atrazine to cladocerans *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia silvestri* and *Macrothrix flabelligera*. **Acta Lim. Bras.**, v. 26, n. 1, p. 1-8, 2014.
- MOREIRA, J. C.; JACOB, S. C.; PERES, F.; LIMA, J. S.; MEYER, A.; OLIVEIRA-SILVA, J. J.; SARCINELLI, P. N.; BATISTA, D. F.; EGLER, M.; FARIA, M. V. C.; ARAÚJO, A. J.; KUBOTA, A. H.; SOARES, M. O.; ALVES, S. R.; MOURA, C. M.; CURI, R. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 7, n. 2, p. 299-311, 2002.
- MORI, Manoel Nunes. **Descontaminação de embalagens de clorpirifós utilizando o processo de oxidação avançada por radiação ionizante**, 2006, 66 f. Dissertação (Mestrado) – Curso em Ciência da Tecnologia Nuclear, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia associada a Universidade de São Paulo, 2006.
- MOURA, Emerson Eduardo Silva de. **Determinação da toxicidade aguda e caracterização de risco ambiental do herbicida Roundup (glifosato) sobre três espécies de peixes**. 2009, 45 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Bioecologia Aquática, Centro de Biociências, Departamento de Oceanografia e Limnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2009.

MUSSULINI, B. H. M.; LEITE, C. E.; ZENKI, K. C.; MORO, L.; BAGGIO, S., RICO, E. P.; ROSEMBERG, D. B.; DIAS, R. D.; SOUZA, T. M.; CALCAGNOTTO, M. E.; CAMPOS, M. M.; BATTASTINI, A. M.; DE OLIVEIRA, D. L. Seizures Induced by Pentylentetrazole in the adult zebrafish: A detailed behavioral characterization. **Plos one**, v. 8, n. 1, 2013.

NAIME, Aline Aita. **Estudos da neurotoxicidade induzida pelo clorpirifós e seu metabólito – oxon em células HT22**, 2017, 102 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.

NEGRO, C.; COLLINS, P. Histopathological effects of chlorpyrifos on the gills, hepatopancreas and gonads of the freshwater crab *Zilchiopsis collastinensis*. Persistent effects after exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 140, p. 116-122, 2017.

NIMMO, D. R. Pesticides. In: RAND, Gary M.; PETROCELLI, Sam R. (Ed.) Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications. **Hemisphere**, p. 335-373, 1985.

NWANI, C. D.; IVOKE, N.; UGWU, D. O.; ATAMA, C.; ONYISHI, G. C.; ECHI, P. C.; OGBONNA, S. A. Investigation on acute toxicity and behavioral changes in a freshwater African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822), exposed to organophosphorous pesticide, termifos®. **Pakistan J. Zool.**, v. 45, n. 4, p. 959-965, 2013.

ORGANIZAÇÃO PARA A COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO (OECD) Guideline for testing of chemicals. **Fish, Acute Toxicity Test**, n. 203, p. 1-9, 17 July 1992.

OLIVEIRA, C. M.; SANTANA, A. C.; HOMMA, A. K. O. Os custos de produção e a rentabilidade da soja nos municípios de Santarém e Belterra, estado do Pará. **Acta Amazonica**, v. 43, n. 1, p. 23–31, 2013.

ORUÇ, Elif Ozcan. Oxidative stress, steroid hormone concentrations and acetylcholinesterase activity in *Oreochromis niloticus* exposed to chlorpyrifos. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 96, n. 3, p. 160–166, 2010.

RENDÓN-VON, O, J.; ORTIZ-ARANA, U.; GUILHERMINO, L.; SOARES, A. M. In vivo evaluation of three biomarkers in the mosquito fish (*Gambusia yucatana*) exposed to pesticides. **Chemosphere**, v. 58, n. 5, p. 627-636, 2005.

PARACAMPO, A.; SOLIS, M.; BONETTO, C.; MUGNI, H. Acute toxicity of chlorpyrifos to the non-target organism *Cnesterodon decemmaculatus*. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 25, n. 1, p. 96-103, 2014.

POWER, A. E.; VAZDARJANOVA, A.; MCGAUGH, J. L. Muscarinic cholinergic influences in memory consolidation. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 80, n. 3, p. 178-193, 2003.

RADHAIHAH, V.; GIRIJA, M.; RAO, K. J. Changes in selected biochemical parameters in the kidney and blood of the fish *Tilapia mossambica* (Peters) exposed to heptachlor. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 39, p. 1006-1011, 1987.

RAO, J. V.; RANI, C. H. S; KAVITHA, P.; RAO, R. N.; MADHAVENDRA, S. S. Toxicity of chlorpyrifos to the fish, *Oreochromis mossambicus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 70, p. 985-992, 2003.

RAO, J. V.; BEGUM, G.; PALLELA, R; USMAN, P. K.; RAO, R. N. Changes in behavior and brain acetylcholinesterase activity in mosquito fish, *Gambusia affinis* in response to the

sub-lethal exposure to chlorpyrifos. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 2, n. 3, p. 478-483, 2005.

RAIBEEMOL, K. P.; CHITRA, K. C.; RAIBI, M. K. P. Histopathological alteration in gill of the freshwater fish *Pseudotroplus maculatus* (Bloch, 1795) under chlorpyrifos toxicity. **Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.**, v. 3, n. 12, p. 141-146, 2016.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; SALLES, F. A.; EIRAS, J. C.; DAS EIRAS, A. C.; ISHIKAWA, C. M.; ALEXANDRINO, A. C. Análise hematológica de curimatá (*Prochilodus scrofa*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) das estações de piscicultura do instituto de pesca. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 25, p. 77-83, 1999.

ROCHA, Alysson Soares da. **Toxicidade aguda e subaguda do triclorfon em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*, CUVIER, 1836)**. 2009, 66 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ciência Animal Tropical, Universidade Federal do Tocantins, 2009.

RODRIGUES, E. D.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; PACHECO, F. J. VEIGA, M. L.; EIRAS, A. C. Efeito agudo do organofosforado Dipterec 500 (Triclorfon) em baço de curimatá *Prochilodus scrofa* (STEINDACHNER, 1881). **B. Inst. Pesca**, v. 24, p. 197-203, 1997.

RODRIGUES, Ana Paula Oeda. **Nutrição e alimentação do tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. Bol. Inst. Pesca, São Paulo., v. 40, n. 1, p. 135-145, 2014.

RODRÍGUEZ-FUENTES, G.; GOLD-BOUCHOT, G. Environmental monitoring using acetylcholinesterase inhibition *in vitro*. A case study in two Mexican lagoons. **Marine Environmental Research**, v. 50, p. 357-360, 2000.

ROEX, E. W.; DE VRIES, E; VAN GESTEL, C. A. Sensitivity of the zebrafish (*Danio rerio*) early life stage test for compounds with different modes of action. **Environ. Pollut.**, v. 120, p. 355-362, 2002.

ROSA, N. N.; PEREIRA, F. O. P.; GARCIA, J. F. C; NUNES, L. V.; SANCHES FILHO, P. J. Sensibilidade do peixe *Phallocceros caudimaculatus* para os sais dicromato de potássio, nitrato de cádmio, nitrato de chumbo e sulfato de zinco. **Natural Resource, Aquibadã**, v. 3, n. 2, p. 31, 2013.

ROTTMANN, R.W., FRANCIS-FLOYD, R.; DURBOROW, R. The role of stress in fish disease. **Southern (Regional Aquaculture Center SRAC Publication)**, n. 474, p. 4, 1992.

RICHMONDS, Chelliah R.; DUTTA, Hiran M. Effect of malathion on the brain acetylcholinesterase activity of bluegill sunfish *Lepomis macrochirus*. Bull. **Environ. Contam. Toxicol.** v. 49, p. 431-435, 1992.

SABINO, José. **Estudo comparativo em comunidades de peixes de riachos da Amazônia Central e Mata Atlântica distribuição espacial, padrões de atividade e comportamento alimentar**. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. 135 p., 2000.

SANCHO, E; FERNÁNDEZ-VEGA, C; VILLARROEL, M. A; ANDREU-MOLINER, E; FERRANDO, M. A. SANCHO. Physiological effects of tricyclazole on zebrafish (*Danio rerio*) and post-exposure recovery. **Comp. Biochem. Physiol. C.**, v. 150, n. 1, p. 25-32, 2009.

SANTOS, G. M.; FERREIRA, E. J. G. Peixes da Bacia Amazônica, p. 345-373. In: LOWE-MCCONNELL, R. H. (Ed). **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. Editora da Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil, 1999.

- SANTOS, V. M. R.; DONNICI, C. L.; DA COSTA, J. B. N.; CAIXEIRO, J. M. R. Organophosphorus pentavalent compounds: history, synthetic methods of preparation and application as insecticides and antitumor agents. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 159-170, 2007.
- SANTOS, Maria da Conceição Freitas. **Caracterização da diversidade genética de populações naturais de tambaqui (*Colossoma macropomum*) através de marcadores moleculares: uma contribuição para conservação da espécie**, 2010, 176 f. Tese (Doutorado) Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2010.
- SANTOS, Edeilton Pereira dos. **Dinâmicas territoriais no processo de expansão do agronegócio da soja e campesinato no Baixo Amazonas-PA**, 2015, 173 f. Dissertação (Mestrado) Curso de Pós-Graduação em Geografia - Universidade Federal do Amazonas, 2015.
- SARTER, Martin; PARIKH, Vinay. Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. **Nature reviews Neuroscience**, v. 6, n. 1, p. 48-56, 2005.
- SCOTT, Graham R.; SLOMAN, Katherine A. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. **Aquatic Toxicology**, v. 68, p. 369-392, 2004.
- SELVI, M.; SARIKAYA, R.; ERKOÇ, F.; KOÇAK, O. Investigation of acute toxicity of chlorpyrifos-methyl on guppy *Poecilia reticulata*. **Chemosphere**, v. 60, n. 1, p. 93-96, 2005.
- SHARBIDRE, A. A.; METKARI, V.; PATODE, P. Effect of methyl parathion and chlorpyrifos on certain biomarkers in various tissues of guppy fish, *Poecilia reticulata*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 101, n. 2, p. 132-141, 2011.
- SILVA, J.; PEREIRA-FILHO, M.; OLIVEIRA-PEREIRA, M. I. Seasonal variation of nutrients and energy in tambaqui's (*Colossoma macropomum*, CUVIER, 1818) natural food. **Rev. Bras. de Biol.**, v. 60, n. 4, p. 599-605, 2000.
- SILVA, Jacqueline Maria da. **Avaliação da sensibilidade de *Colossoma macropomum* G. Cuvier, 1818 (Tambaqui) como espécie sentinela para o herbicida trifluralina**. 2013, 86 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas – Maceió, 2013.
- SILVA, Susana Maria Sousa da. **Intoxicações por inibidores da Acetilcolinesterase: etiologia, diagnóstico e tratamento**, 2015, 44 f. Dissertação (Mestrado) – Centro Integrado em Medicina, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Coimbra, Portugal, 2015.
- SIOLI, Harald. **Amazônia: fundamentos da ecologia da maior região de florestas tropicais**. (Ed.) Vozes. Petrópolis, Rio de Janeiro, 1985.
- SIQUEIRA, A. A.; CUNHA, A. F.; MARQUES, G. L. M.; FELIPPE, I. S. A.; MINASSA, V. S.; GRAMELICH, T. C. D. S.; CICILINI, M. A.; ALARCON, T. A.; PIRES, R. G. W.; SAMPAIO, K. N.; BEIJAMINI, V. Atropine counteracts the depressive-like behaviour elicited by acute exposure to commercial chlorpyrifos in rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 71, p. 6-15, 2019.
- SLANINOVA, A.; SMUTNA, H.; MODRA, H.; SVOBODOVA, Z. A review: Oxidative stress in fish induced by pesticides. **Neuroendocrinology Letters**. v. 30, n. 1, p. 2-12, 2009.
- SLOTKIN, T. A.; OLIVER, C. A.; SEIDLER, F. J. Critical periods for the role of oxidative stress in the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos and terbutaline, alone or in combination. **Brain Research Development**, v. 157, p. 172-180, 2005.

SOTO-OTERO, R.; MENDEZ-ALVAREZ, E.; SIERRA-PAREDES, G.; GALAN-VALIENTE, J.; AGUILAR-VEIGA, E. High-performance liquid chromatographic procedure for quantitative determination of pentylenetetrazol in serum and discrete areas of rat brain. **Anal. Biochem.**, v. 165, p. 331–336, 1987.

SOUMIS, N.; ROULET, M.; LUCOTTE, M. Characterization of pesticide consumption in the county of Santarém, Pará, Brazil. **Acta Amaz.**, v. 30, n. 4, Amazonas, 2000.

SOUMIS, N.; LUCOTTE, M.; SAMPAIO, D.; ALMEIDA, D. C.; GIROUX, D.; MORAIS, S.; PICHET, P. Presence of Organophosphate Insecticides in fish of the Amazon River. **Acta Amaz.**, v. 33, n. 2, Manaus, 2003.

SOUZA, T. M.; SACZK, A. A.; MAGRIOTIS, Z. M.; PEREIRA, R. A.; PINTO, F. M.; FERREIRA, A. F. F.; ANDRADE, T. C. Recuperação e aplicação do dicromato de potássio proveniente do resíduo de Sulfocromica. **Rev. Virtual Quim.** v. 6, n. 2, p. 453-466, 2014.

SOUZA-BASTOS, L. R.; VAL, A. L.; WOOD, C. M. Are Amazonian fish more sensitive to ammonia? Toxicity of ammonia to eleven native species. The International Journal of Aquatic, Sciences. *In:* (Ed.) **Hydrobiologia**, v. 766, n. 2, 2016.

SOUZA, Thayana Cruz de. **Toxicidade aguda de agrotóxicos e curva de sensibilidade de espécies para peixes amazônicos**, 2014, 63 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências do Ambiente e Sustentabilidade na Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, 2014.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F.; LUCHINI, L. C.; ANDRÉA, M. M. Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. **Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente**, 2004. 29 p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 42).

SVOBODA, Z.; LUSKOVÁ, V.; DRASTICHOVÁ, J.; SVOBODA, M.; ZLÁBEK, V. Effect of deltamethrin on hematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Acta Vet. Brn**, v. 2003, n. 72, p. 79-85, 2003.

SUNANDA, M.; JAMMU, C. S. R.; NEELIMA, P.; RAO, K. G. Effects of chlorpyrifos (an Organophosphate Pesticide) in fish. **Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.**, v. 9, n. 59, p. 299-305, 2016.

TAVARES-DIAS, Marcos. **Uso e principais aplicações do sal comum na piscicultura de água doce**. Ed. 1. Marcos Tavares-Dias; Daniel Montagner. Embrapa: Macapá, Amapá, 2015, 38 p. (Documentos 89/ Embrapa/Amapá: ISSN 1517-4859).

TEREZA, Fabrício Barreto; GONÇALVES-DE-FREITAS, Eliane. Interação agonística em *Geophagus surinamenses* (Teleostei: Cichlidae). **Revista de Etologia**, v. 5, n. 2, p. 121-126, 2003.

TESTAI, E.; FRANCA, M. B.; DI CONSIGLIO, E. **Chlorpyrifos**. (Ed.) Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology. Chapter 70, p. 1505-1519. Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy, 2010.

TILAK, K. S.; VEERAIHAH, K.; RAO, D. K. Toxicity and bioaccumulation of Chlorpyrifos in Indian Carp *Catla catla* (Hamilton), *Labeo rohita* (Hamilton), and *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** v. 73, p. 933-941, 2004.

TOMITA, Rúbia Yuri; BEYRUTH, Zuleika. Toxicologia de agrotóxico em ambientes aquáticos. **O Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 135-142, 2002.

TORRES, Maurício. (Org.) **Amazônia revelada: os descaminhos ao longo da BR-163**. Brasília: CNPQ. 496 p., 2005.

TÕUGU, Vello. Acetyl cholinesterase: mechanism of catalysis and inhibition. **Cur Med Chem Cent Nerv System Agents**, v. 1, p. 155-170, 2006.

TOY, Arthur D. F. **Phosphorus chemistry in everyday living**. American Chemical Society: Washington, DC, 1976.

TUNDISI, José Galisia; TUNDISI, Takako Matsumura. **Limnologia**. (Ed.) São Paulo: Oficina de Textos, 2008. ISBN: 978-85-86238-66-6.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). **Methods for mensuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms**. Ed. 5. Outubro, 2002, 275 p.

VALE, J. A. Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. **Toxicol. Letters**, n. 102-103, p. 649-652, 1998.

VARI, R. P.; MALABARBA, L. R. Ictiologia Neotropical: uma visão geral. p. 1-11, 1998. In: MALABARBA *et al.* (Ed.). **Filogenia e Classificação de Peixes Neotropicais**. Porto Alegre: Edipucrs, 603 p., 1998.

VARÓ, I.; SERRANO, R.; PITARCH, E.; AMAT, F.; LÓPEZ, F. J.; NAVARRO, J. C. Toxicity and bioconcentration of chlorpyrifos in aquatic organisms: *Artemia parthenogenetica* (Crustacea), *Gambusia affinis*, and *Aphanius iberus* (Pisces) bull. **Environ. Contam. Toxicol.**, v. 6, p. 623-630, 2000.

VENKATESWARA, R. J.; PARVATHI, K.; KAVITHA, P.; JAKKA, N. M.; PALLELA, R. Effect of chlorpyrifos and monocrotophos on locomotor behaviour and acetylcholinesterase activity of subterranean termites, *Odontotermes obesus*. **Pest. Manage Sci.**, v. 61, p. 417-421, 2005.

VENTURA, A. L. M.; ABREU, P. A.; FREITAS, R. C. C.; SATHLER, P. C.; LOUREIRO, N.; CASTRO, H. C. Colinergic system: revisiting receptors, regulation and the relationship with Alzheimer disease, schizophrenia, epilepsy and smoking. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 37, n. 2, p. 66-72, 2010.

VENTURA, C.; NIETO, M. R.; BOURGUIGNON, N.; LUX-LANTOS, V.; RODRIGUEZ, H.; CAO, G.; RANDI, A.; COCCA, C.; NÚÑEZ, M. Pesticide chlorpyrifos acts as an endocrine disruptor in adult rats causing changes in mammary gland and hormonal balance. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 156, p. 1-9, 2016.

VENTURIERI, A.; COELHO, A. S.; THALES, M. C.; BACELAR, M. D. R. Análise da expansão da agricultura de grãos na região de Santarém e Belterra, Oeste do estado do Pará. In: **Anais do Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto (SBSR)**, v. 7, p. 7003-7010, 2007. Florianópolis/SC São José dos Campos: INPE, 2007. ISBN 978-85-17-00031-7.

VENTURINI, Francine Perri. **Toxicidade aguda e respostas metabólicas e hematológicas do pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) exposto a concentração subletal de triclorfon e recuperação**. 2010, 78 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Genética e Evolução, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, 2010.

- VENTURINI, F. P.; MORAES, F. D.; CORTELLA, L. R.; ROSSI, P. A.; CRUZ, C.; MORAES, L. Metabolic effects of trichlorfon (Masoten) on the neotropical freshwater fish pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Fish Physiol. Biochem.**, 2014. Doi:10.1007/s10695-014-9983-y.
- WAICHMAN, Andréa Viviana. Uma proposta de avaliação integrada de risco do uso de agrotóxicos no estado do Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 38, n. 1, p. 45-51, 2008.
- WALSH, T. K.; LYNDON, A. R.; JAMIESON, D. J. Identification of cDNAs induced by the organophosphate trichlorphon in the parasitic copepod *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda; Caligidae). **Pest Biochem and Physiol.**, n. 88, p. 26-30, 2007.
- WANG, X.; LI, J.; XING, H.; XU, S. Review of Toxicology of Atrazine and Chlorpyrifos on Fish. **Journal of Northeast Agricultural University (English Edition)**, v. 18, n. 4, p. 88-92, 2011.
- WOKE, G.; ALELEYE-WOKOMA, I. Effects of pesticide (chlorpyrifos ethyl) on the Fingerlings of catfish (*Clarias gariepinus*). **Global Journal of Pure and Applied Sciences**, v. 15, n. 3-4, p. 265-266, 2009.
- WOLFF, Luciano L.; DONATTI, Lucélia. Estudo do comportamento do peixe de água doce *Phalloceros harpagos* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) submetido à alteração artificial do pH. **Luminária**, União da Vitória, v. 18, n. 1, p. 10-21, 2016.
- WENDELAAR BONGA, Sjoerd E. The modulating effect of individual differences on the impact of multiples stressors. **Comp. Biochemicals Physiol. Part A.**, v. 151, n. 1, p. 1-19, 2008.
- XING, H.; WANG, X.; SUN, G.; GAO, X.; XU, S.; WANG, X. Effects of atrazine and chlorpyrifos on activity and transcription of glutathione S-transferase in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 33, p. 233-244, 2012.
- YASEEN, M.; EHSAN, N.; QAMAR, S. U. R.; ALI, A.; KHAN, W. A.; KHAN, A. Effect of organophosphate pesticide (chlorpyrifos, fipronil, and malathion) on certain organs of *Rattus rattus*. **GSC Biological and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 3, p. 11-15, 2019.
- ZACARDI, D. M.; LIMA, M. A. S.; NASCIMENTO, M. M.; ZANETTI, C. R. M. Caracterização socioeconômica e produtiva da aquicultura desenvolvida em Santarém, Pará. **Acta Fish**, v. 5, n. 3, p. 102-112, 2017.
- ZAGATTO, Pedro A.; BERTOLLETI, Eduardo. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. Edição 2, São Carlos: Rima, 486 p., 2008.



## ANEXOS

### ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UFOPA

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Determinação para peixes amazônicos da ecotoxicidade e risco de pesticidas utilizados em lavouras de soja” protocolado sob o número Nº 06004-2016, sob a responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Lincoln Lima Corrêa** vinculado(a) ao Instituto de Ciências e Tecnologia das Águas – ICTA/UFOPA está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Oeste do Pará.

Santarém, 14 de setembro de 2016.

